

**Vergleich verschiedener Nährböden
zum Nachweis von Proteolyten in Rohmilch
sowie Säuglings- und Kleinkindernahrung**

Berthold Laufer

Disbui. München

1987

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

**Vergleich verschiedener Nährböden
zum Nachweis von Proteolyten in Rohmilch
sowie Säuglings- und Kleinkindernahrung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Berthold L a u f e r

aus

Hardt

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

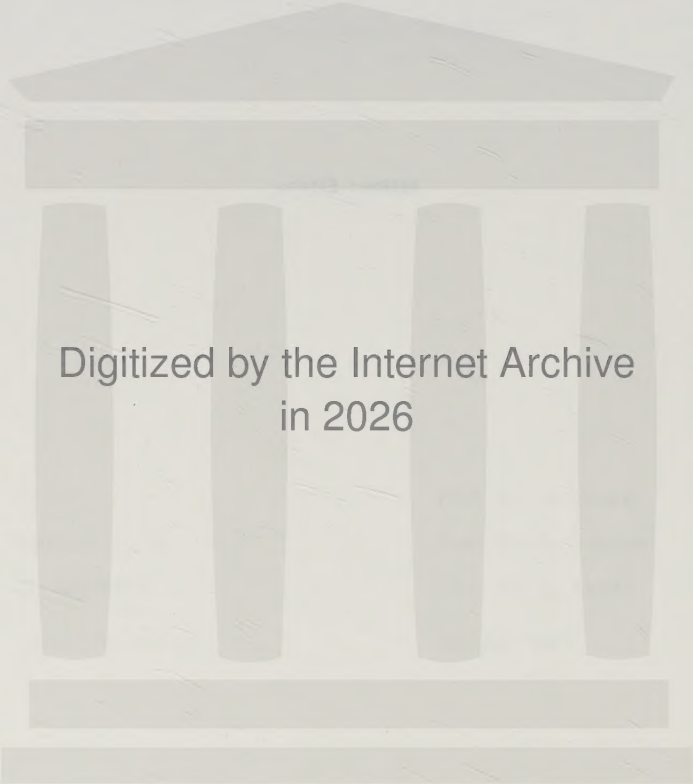
Dekan:	Prof. Dr. H. Zucker
Referent:	Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent:	Prof. Dr. E. Munz
Tag der Promotion:	24. Juli 1987



drucken + binden
gmbh
Schellingstraße 23
8000 München 40
☎ 089/28 44 45

Meinen Eltern

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	2
2.1	Definition der Biologie	2
2.2	Historische Entwicklung der Biologie	2
2.3	Methoden der biologischen Forschung	3
2.4	Einfluss der Biologie auf andere Wissenschaften	3
2.5	Die Rolle der Biologie in der Gesellschaft	3
2.6	Die Bedeutung der Biologie für die Zukunft	3
3	Die Biologie der Pflanzen	4
3.1	Die Pflanze als Lebewesen	4
3.2	Die Pflanze als Nahrungsquelle	4
3.3	Die Pflanze als Umweltfaktor	4
3.4	Die Pflanze als Medizin	4
3.5	Die Pflanze als Kulturpflanze	4
3.6	Die Pflanze als Zierpflanze	4
3.7	Die Pflanze als Modellorganismus	4
3.8	Die Pflanze als Indikator	4
3.9	Die Pflanze als Bioindikator	4
3.10	Die Pflanze als Bioakkumulator	4
3.11	Die Pflanze als Biofilter	4
3.12	Die Pflanze als Biosensor	4
3.13	Die Pflanze als Bioreaktor	4
3.14	Die Pflanze als Biokatalysator	4
3.15	Die Pflanze als Biomedizin	4
3.16	Die Pflanze als Biotechnologie	4
3.17	Die Pflanze als Bioprodukt	4
3.18	Die Pflanze als Biokonverter	4
3.19	Die Pflanze als Bioreporter	4
3.20	Die Pflanze als Biobiosensor	4
3.21	Die Pflanze als Biobioindikator	4
3.22	Die Pflanze als Biobioakkumulator	4
3.23	Die Pflanze als Biobiofilter	4
3.24	Die Pflanze als Biobioreaktor	4
3.25	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.26	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.27	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.28	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.29	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.30	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.31	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.32	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.33	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.34	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.35	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.36	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.37	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.38	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.39	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.40	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.41	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.42	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.43	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.44	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.45	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.46	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.47	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.48	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.49	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.50	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.51	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.52	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.53	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.54	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.55	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.56	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.57	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.58	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.59	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.60	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.61	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.62	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.63	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.64	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.65	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.66	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.67	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.68	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.69	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.70	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.71	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.72	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.73	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.74	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.75	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.76	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.77	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.78	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.79	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.80	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.81	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.82	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.83	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.84	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.85	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.86	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.87	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.88	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.89	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.90	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.91	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.92	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.93	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.94	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.95	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.96	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.97	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.98	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.99	Die Pflanze als Biobiochemie	4
3.100	Die Pflanze als Biobiochemie	4



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554616_0020

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1 Definition der Proteolyten	2
2.2 Eigenschaften der bakteriellen Proteinasen	2
2.2.1 Definition der proteolytischen Enzyme	2
2.2.2 Extrazelluläre Natur der bakteriellen Proteinaseaktivität	7
2.2.3 Zahl der von einem Bakterienstamm produzierten verschiedenen Proteinasen	7
2.2.4 Biochemische Eigenschaften bakterieller Proteinasen	8
2.2.5 Hitzeresistenz bakterieller Proteinasen	9
2.2.6 Bedeutung der Proteinasen für die Versorgung der Bakterien mit Aminosäuren	13
2.3 Bedeutung der Proteolyten in Lebensmitteln	14
2.3.1 Proteolyten als Verderbserreger	14
2.3.1.1 Allgemeines	14
2.3.1.2 Verderb von Fisch und Fleisch	15
2.3.1.3 Verderb von Milch und Milchprodukten	16
2.3.1.3.1 Allgemeines	16
2.3.1.3.2 Abbau der Caseine	18
2.3.1.3.3 Abbau der Molkenproteine	19
2.3.1.3.4 Psychrotrophe Proteolyten der Milch	20
2.3.1.3.5 Thermophile Proteolyten der Milch	24
2.3.2 Lebensmitteltechnologische Bedeutung von Proteolyten	25
2.3.3 Proteolyten als Krankheitserreger	27
2.4 Spezielle Bedeutung von Verderb verursachenden Proteolyten in Milch und Milchprodukten	31
2.4.1 Rohmilch	31
2.4.1.1 Proteolytenspecies in Rohmilch	31
2.4.1.2 Herkunft der Proteolyten in Rohmilch	32
2.4.1.2.1 Sekretorischer Keimgehalt	32
2.4.1.2.2 Postsekretorischer Keimgehalt	32
2.4.1.3 Bedeutung der Proteolyten in Rohmilch	33

2.4.2	Pasteurisierte Milch	34
2.4.3	Ultrahocherhitzte Milch	34
2.4.4	Milchtrockenprodukte	35
2.4.5	Käse	38
2.4.6	Butter	39
2.5	Nährböden zum Nachweis von Proteolyten	41
2.5.1	Allgemeines	41
2.5.2	Falsch-positive Ergebnisse auf Milchagarnährböden	42
3.	Eigene Untersuchungen	49
3.1	Untersuchungen zur Elektivität klarer und trüber Nährböden zum Nachweis von Proteolyten	49
3.1.1	Material und Methodik	49
3.1.1.1	Nährböden	49
3.1.1.1.1	Zusammensetzung der Nährböden	49
3.1.1.1.2	Herstellung der Nährböden	51
3.1.1.2	Vergleichende Untersuchungen mit Reinkulturen an trüben und klaren Nährböden zum Nachweis von Proteolyten	55
3.1.1.2.1	Kulturen	55
3.1.1.2.2	Herstellung, Bebrütung und Auswertung der Reinkulturausstriche	55
3.1.1.3	Vergleichende Untersuchungen mit <i>Bacillus cereus</i> -Stämmen an drei verschiedenen trüben Caseinatnährböden	56
3.1.2	Ergebnisse	57
3.1.2.1	Ergebnisse der Untersuchungen mit Reinkulturen an trüben und klaren Nährböden zum Nachweis von Proteolyten	57
3.1.2.1.1	Versuche mit Isolaten aus Vorzugsmilch	57
3.1.2.1.2	Versuche mit Kulturen aus der Stammsammlung	57
3.1.2.2	Ergebnisse der Untersuchungen mit <i>Bacillus cereus</i> -Stämmen an drei verschiedenen trüben Caseinatnährböden	58
3.2	Vergleich der Produktivität verschiedener Nährböden bei der Zählung von Caseolyten in Rohmilch	62
3.2.1	Material und Methodik	62
3.2.1.1	Milchproben	62
3.2.1.2	Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Nährböden	62
3.2.1.3	Untersuchung der Vorzugsmilch- und Anlieferungsmilchproben	62

	Seite
3.2.1.3.1 Vorbereitung, Ansatz und Bebrütung	62
3.2.1.3.2 Auswertung	64
3.2.1.4 Identifizierung von Isolaten, die auf MA falsch-positive Ergebnisse erbrachten	64
3.2.2 Ergebnisse	65
3.2.2.1 Caseolytengehalte der Rohmilchproben	65
3.2.2.2 Identifizierung von Isolaten, die auf MA falsch-positive Ergebnisse erbrachten	71
3.3 Vergleich der Produktivität verschiedener Nährböden bei der Zählung von Caseolyten in Milchtrockenprodukten	72
3.3.1 Material und Methodik	72
3.3.1.1 Probenmaterial	72
3.3.1.2 Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Nährböden	72
3.3.1.3 Untersuchung der Milchtrockenprodukte	72
3.3.1.3.1 Vorbereitung, Ansatz und Bebrütung	72
3.3.1.3.2 Auswertung	73
3.3.1.4 Differenzierung von aus Milchtrockenprodukten isolierten Caseolyten	73
3.3.2 Ergebnisse	73
3.3.2.1 Ermittelte Caseolytengehalte der Milchtrockenprodukte	73
3.3.2.2 Differenzierung von aus Milchtrockenprodukten isolierten Caseolyten	76
4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion	77
4.1 Produktivität der Nährböden bei der Zählung von Caseolyten in Rohmilch	78
4.1.1 Einfluß der Bebrütungstemperatur	78
4.1.2 Einfluß der Bebrütungszeit	80
4.1.3 Vergleich der Ergebnisse von den verschiedenen Nährböden untereinander	82
4.2 Produktivität der Nährböden bei der Zählung von Caseolyten in Milchtrockenprodukten	84
4.2.1 Einfluß der Bebrütungstemperatur	84
4.2.2 Einfluß der Bebrütungszeit	86
4.2.3 Vergleich der Ergebnisse von den verschiedenen Nährböden untereinander	88

4.3	Elektivität der Nährböden zum Nachweis von Proteolyten	90
4.4	Bemerkungen zur Praktikabilität und zur Zusammensetzung einiger Nährböden	99
4.5	Zählung von Caseolyten in Säuglingsnahrung im Hinblick auf gesundheitliche Risiken	101
5.	Zusammenfassung / Summary	103
6.	Literaturverzeichnis	107

1. Einleitung

Species und Stämme zahlreicher Bakteriengattungen sind in der Lage, Eiweiß abzubauen. Im Zusammenhang mit Milch und Milchprodukten sind solche als Proteolyten oder Caseolyten bezeichnete Keime in erster Linie als Verderbserreger von Bedeutung. Einzelne technologisch erwünschte Species tragen in bestimmten Produkten allerdings auch zur Aromabildung bei. Manche Proteolyten schließlich gelten als "Lebensmittelvergifter", wobei neuere Erkenntnisse dafür sprechen, daß diese Eigenschaft im allgemeinen auf spezifischen pathogenen Prinzipien beruht. Insbesondere Bazillen, aber auch anderen Proteolyten, wurde lange Zeit pathogene Bedeutung wegen der Freisetzung toxischer Eiweißabbauprodukte, zum Teil in Verbindung mit der Bildung spezifischer Toxine, zugeschrieben. Der Tatsache, daß Bazillen in Milchtrockenprodukten oft einen hohen Anteil an der Keimflora ausmachen und sich vor allem in aus Milchpulver rekonstituierter Milch unter Ausschluß einer antagonistischen Flora stark vermehren können, schenkte man Ende der fünfziger Jahre angesichts des zunehmenden Einsatzes von Milchtrockenprodukten in der Säuglingsernährung größere Beachtung. Es wurde gefordert, für solche Milchtrockenprodukte, die bis zu dieser Zeit in der Bundesrepublik Deutschland einer "bakteriologisch-hygienischen Überwachung" (ROEMMELE und WESTPHAL, 1957) nicht unterlagen, unter anderem Grenzwerte hinsichtlich des Gehaltes an aeroben Sporenbildnern und "sonstigen Kaseolyten" festzusetzen. Diese Vorstellungen fanden Eingang in die Verordnung über diätetische Lebensmittel vom 20. Juni 1963, welche in der aktuellen Fassung vom 21. Januar 1982 in § 14 Abs. 2 Nr. 4c eine Begrenzung des Proteolytengehaltes von auf Milchpulverbasis hergestellten diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge oder Kleinkinder auf "nicht mehr als 150 aerobe sporenbildende oder andere eiweißlösende Bakterien (Kaseolyten)" in 0,1 g des trockenen Lebensmittels vorschreibt. Der zur Zählung der Caseolyten nach Anlage 5 der Diät-Verordnung zu verwendende "Calcium-Kaseinat-Agar" hat allerdings den Nachteil, daß er sehr arbeitsaufwendig herzustellen ist. Im Hinblick auf eine zu erwartende Änderung der Diät-Verordnung sollten deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene, nach Möglichkeit einfach herzustellende Nährböden bezüglich ihrer Elektivität und Produktivität bei der Zählung von Caseolyten mit dem zur Zeit in der Diät-Verordnung vorgeschriebenen Nährboden verglichen werden, um zu prüfen, ob sich eines oder mehrere dieser Medien als zumindest gleichwertig und damit für eine Vereinfachung des Caseolytennachweises geeignet erweisen würden.

2. Schrifttum

2.1 Definition der Proteolyten

Proteolyten sind Mikroorganismen, die Eiweiß abbauen können (HAUKE, 1967). Neben vielen Bakterien sind hierzu auch Schimmelpilze (CREWTER und LENNOX, 1950; MATSUBARA und FEDER, 1971; COHEN, 1977) und Hefen (AHEARN et al., 1968; KAZANAS, 1968; TERPLAN, 1969; MADDOX und HOUGH, 1970; O'CONNOR et al., 1986) befähigt. Im engeren Sinne werden die Proteolyten als heterogene Gruppe von Bakterien aufgefaßt, die extrazelluläre Proteinasen bilden (FRAZIER und WESTHOFF, 1978a). Diesen Enzymen gleichgestellt werden auch zellwandgebundene Proteinasen, wie sie bei Milchsäurestreptokokken (THOMAS et al., 1974; EXTERKATE, 1975; EXTERKATE, 1976; GEIS et al., 1985) und Laktobazillen (EZZAT et al., 1985) gefunden wurden (LAW, 1980). Während alle Bakterien intrazelluläre Proteinasen besitzen, weist nur eine begrenzte Zahl von Arten extrazelluläre proteolytische Enzyme auf, darunter viele Species der Gattungen Clostridium, Bacillus, Pseudomonas und Proteus (FRAZIER und WESTHOFF, 1978a). Daneben finden sich Proteolyten aber noch in zahlreichen anderen Gattungen (siehe Tabelle 1). Proteolyten, die Casein abbauen, werden im übrigen auch als Caseolyten bezeichnet (HAUKE, 1967).

Manche Bakterien bilden Säure und proteolysieren zugleich (Acidoproteolyten). Andere sind Fäulniserreger, d.h. sie bauen Proteine anaerob ab und setzen dabei faulig riechende Verbindungen wie Schwefelwasserstoff, Mercaptane, Amine, Indole und Fettsäuren frei. Hierzu gehören die meisten proteolytischen Species der Gattung Clostridium, ebenso wie einige Species von Proteus und Pseudomonas und anderer nicht sporenbildender Gattungen (FRAZIER und WESTHOFF, 1978a).

2.2 Eigenschaften der bakteriellen Proteinasen

2.2.1 Definition der proteolytischen Enzyme

Proteolytische Enzyme oder Peptidasen im weiteren Sinne sind Enzyme, die die Hydrolyse einer Peptidbindung katalysieren. Nach dem Angriffspunkt an der Peptidkette unterscheidet man Endopeptidasen oder Proteinasen von Exopeptidasen oder Peptidasen im engeren Sinn. Die Endopeptidasen spalten Peptidbindungen innerhalb der Kette und wirken damit vorwiegend auf Proteine und höhere Po-

Tabelle 1: Bakterienfamilien und -gattungen, zu denen proteolytische Species bzw. Stämme gehören

Familie	Gattung	Autor(en)
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> ¹	VAN DER ZANT (1957) SCHÖNBERG und KRAUS (1958) KRAUS (1960b) KAZANAS (1968) MAYERHOFER et al. (1971) PÜRSCHEL und POLLACK (1972) MAYERHOFER et al. (1973) ADAMS et al. (1975) BOETHLING (1975) DAINTY et al. (1975) BARACH et al. (1976a, 1976b) COUSIN und MARTH (1977) DeBEUKELAR et al. (1977) LAW et al. (1977) WHITE et al. (1978) LAW et al. (1979) MUIR et al. (1979) CHRISTOPHERSEN (1980) GEBRE-EGZIABHER et al. (1980a, 1980b) KARNOP (1982b) LEINMÜLLER und CHRISTOPHERSEN (1982) GALLMANN und PUHAN (1983) JACKMAN et al. (1983) PATEL et al. (1983a, 1983b) KROLL und KLOSTERMEYER (1984) KROLL et al. (1984) STEPANIAK und FOX (1985) YAN et al. (1985) MITCHELL et al. (1986) O'CONNOR et al. (1986)
	<i>Xanthomonas</i>	LAW et al. (1979) O'CONNOR et al. (1986)
Neisseriaceae	<i>Moraxella</i>	KARNOP (1982b)
	<i>Acinetobacter</i>	LAW et al. (1979) KARNOP (1982b)
(Weitere gramneg. aerobe Stäbchen und Kokken)	<i>Alteromonas</i>	KARNOP (1982b)
	<i>Flavobacterium</i>	FRAZIER und RUPP (1928, 1931) KAZANAS (1968) COUSIN und MARTH (1977) MUIR et al. (1979) KARNOP (1982b) KROLL et al. (1984) JOOSTE et al. (1986)

Tabelle 1 (Fortsetzung):

Familie	Gattung	Autor(en)
(Weitere gramneg. aerobe Stäbchen und Kokken) (Fortsetzung)	Alcaligenes	FRAZIER und RUPP (1931) MUIR et al. (1979) KARNOP (1982b) ZABORNIK und KNAUT (1984)
	"Achromobacter" ²	FRAZIER und RUPP (1928, 1931) PÜRSCHER und POLLACK (1972) DeBEUKELAR et al. (1977) KARNOP (1982b)
	Cytophaga ³	LAW et al. (1979)
Enterobacteriaceae	Escherichia	TERPLAN (1969) MAYERHOFER et al. (1973) WHITE et al. (1978) JUVEN et al. (1981) GALLMANN und PUHAN (1983)
	Citrobacter	JUVEN et al. (1981)
	Klebsiella	JUVEN et al. (1981)
	Enterobacter	JUVEN et al. (1981)
	Serratia	FRAZIER und RUPP (1931) ARNOLD und MURPHY (1975) JUVEN et al. (1979, 1981) KROLL et al. (1984) MITCHELL et al. (1986)
	Proteus	FRAZIER und RUPP (1931) HAMPSON et al. (1963) ARNOLD und MURPHY (1975) LAW et al. (1979)
	Aeromonas	KIELWEIN et al. (1969) PÜRSCHER und POLLACK (1972) DAINTY et al. (1975) LAW et al. (1979) KARNOP (1982b)
Vibrionaceae		
(Weitere fakultativ anaerobe gramneg. Stäbchen)	Chromobacterium	MUIR et al. (1979)
Micrococcaceae	Micrococcus	FRAZIER und RUPP (1928, 1931) SCHÖNBERG und KRAUS (1956a) BAIRD-PARKER (1963, 1965) KAZANAS (1968) TERPLAN (1969) NATH und LEDFORD (1972) COUSIN und MARTH (1977) DeBEUKELAR et al. (1977) KARNOP (1982b)

Tabelle 1 (Fortsetzung):

Familie	Gattung	Autor(en)
Micrococcaceae (Fortsetzung)	Staphylococcus	FRAZIER und RUPP (1928, 1931) BAIRD-PARKER (1963, 1965) TERPLAN (1969) HASCHKE et al. (1977) KARNOP (1982b)
(Weitere grampos. Kokken)	Streptococcus Lancefield-Gruppe D ⁴	FRAZIER und RUPP (1928, 1931) KROLL et al. (1984)
	Lancefield-Gruppe N (Milchsäurebildner)	FRAZIER und RUPP (1931) VAN DER ZANT und NELSON (1953) WILLIAMSON et al. (1964) MILLER und KANDLER (1967a, 1967c) THOMAS et al. (1974) EXTERKATE (1975, 1976) SINGH und SHARMA (1983) GEIS et al. (1985)
	Streptococcus thermophilus	MILLER und KANDLER (1967a, 1967c) SINGH und SHARMA (1983)
	Ohne nähere Angaben	KRAUS (1956) SCHÖNBERG und KRAUS (1956a) TERPLAN (1969)
	Sarcina ⁵	BAIRD-PARKER (1963, 1965) KAZANAS (1968) TERPLAN (1969)
(Grampos. Stäbchen)	Bacillus	FRAZIER und RUPP (1928, 1931) KRAUS (1956) SCHÖNBERG und KRAUS (1956a, 1958) KRAUS (1960b) FURUKAWA et al. (1968) KAZANAS (1968) CHOUDHERY und MIKOLAJCIK (1969) TERPLAN (1969) KIM und GOEPFERT (1971) OVERCAST und ATMARAM (1974) WASHAM et al. (1977) WHITE et al. (1978) CHOPRA und MATHUR (1984, 1985) YAN et al. (1985)
	Clostridium	ROSENBERGER (1951) BHADSAVLE et al. (1972)

Tabelle 1 (Fortsetzung):

Familie	Gattung	Autor(en)
(Grampos. Stäbchen) (Fortsetzung)	Lactobacillus	FRAZIER und RUPP (1931) BRANDSAETER und NELSON (1956) MILLER und KANDLER (1967a, 1967b, 1967c) TERPLAN (1969) COUSIN und MARTH (1977) DeBEUKELAR et al. (1977) SINGH und SHARMA (1983) EZZAT et al. (1985)
	Corynebacterium	KAZANAS (1968) KARNOP (1982b)
	Brevibacterium	KAZANAS (1968) TERPLAN (1969)

- Anmerkungen:
- 1) Die Species "Pseudomonas putrefaciens" wird jetzt dem Genus Alteromonas zugeordnet (BAUMANN et al., 1984).
 - 2) Nun klassifiziert als Alcaligenes oder Acinetobacter (JUNI, 1984; KERSTERS und DE LEY, 1984).
 - 3) In der 1. Auflage von "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Band 1 (1984) wird das Genus "Cytophaga" nicht mehr eigens aufgeführt; es finden sich dort aber auch keine Angaben, welchen Genera die in der 8. Auflage von "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" beschriebenen Cytophaga species (LEADBETTER, 1974) nun zugeordnet werden (siehe HOLMES et al., 1984).
 - 4) Nach einem Vorschlag von SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1984) werden die D-Streptokokken Streptococcus faecalis und Streptococcus faecium nun in einem eigenen Genus "Enterococcus" als Enterococcus faecalis und Enterococcus faecium von den übrigen D-Streptokokken Streptococcus bovis und Streptococcus equinus abgetrennt.
 - 5) Außer Sarcina ventriculi und Sarcina maxima werden die anderen, in der 7. Auflage von Bergey's Manual (1957) noch zur Gattung Sarcina gerechneten Species nun den Genera Methanosarcina, Sporosarcina, Micrococcus und Halococcus zugeordnet (CANALE-PAROLA, 1974).

lypeptide ein, die Exopeptidasen, die nur von einem Ende der Peptidkette her spalten, hydrolysieren bevorzugt kleinere Polypeptide (PERLES und COURTOIS, 1964).

Nicht klar definiert ist der Begriff "Protease". Während er vereinzelt als Überbegriff für Exopeptidasen und Endopeptidasen verwendet wird (PERLES und COURTOIS, 1964; FRAZIER und WESTHOFF, 1978c; JAKUBKE und JESCHKEIT, 1981), gebraucht man ihn heute in der Regel als Synonym für "Endopeptidasen": So sprechen z.B. ADAMS et al. (1975), LAW et al. (1977), PRIEST (1977), LEINMÜLLER und CHRISTOPHERSEN (1982) und BAKER (1983) ausschließlich von "Proteasen", während MORIHARA (1974), LAW (1979, 1980), STEPANIAK und FOX (1985) sowie FAIRBAIRN und LAW (1986) nur den Begriff "Proteinasen" gebrauchen. Im folgenden wird der Ausdruck "Proteinase" verwendet.

2.2.2 Extrazelluläre Natur der bakteriellen Proteinaseaktivität

FERMI (1890) war offenbar der erste, der zeigte, daß der keimfreie Extrakt des Kulturmediums von Gelatine verflüssigenden Bakterien proteolytisch aktiv war. EIJKMAN (1901) wies auf Magermilchagar die caseolytische Wirkung einer sterilfiltrierten Bouillonkultur von "*B. pyocyaneus*" (jetzt *Pseudomonas aeruginosa*, siehe DOUDOROFF und PALLERONI, 1974) nach. LAW et al. (1977) zeigten, daß die Proteinaseaktivität eines *Pseudomonas fluorescens*-Stammes extrazellulär und nicht zellgebunden oder intrazellulär lokalisiert ist: Milchproben, die unmittelbar nach Zugabe von auf Nähragar gezüchteten, gewaschenen Zellen des *Pseudomonaden*stammes (etwa 10^7 koloniebildende Einheiten/ml) ultrahocherhitzt worden waren, gelierten nach 8 Wochen Lagerung bei Zimmertemperatur nicht. Eine elektrophoretische Analyse zeigte, daß das Casein während dieses Zeitraums intakt geblieben war. Dagegen gelierten ultrahocherhitzte Milchproben, die die zellfreien Waschlösungen der *Pseudomonaden* enthielten, innerhalb von 7 Tagen; das Casein war weitgehend abgebaut.

2.2.3 Zahl der von einem Bakterienstamm produzierten verschiedenen Proteinasen

Die meisten *Pseudomonas*-Stämme produzieren nur eine einzige Proteinase (MAYERHOFER et al., 1973; ADAMS et al., 1975; BOETHLING, 1975; GEBRE-EGZIABHER et al., 1980a; PATEL et al., 1983a; PATEL et al., 1983b; KROLL

und KLOSTERMEYER, 1984; MITCHELL et al., 1986). LEINMÜLLER und CHRISTOPHERSEN (1982) jedoch gewannen aus dem Kulturüberstand eines *Pseudomonas fluorescens*-Stammes fünf proteolytische Fraktionen. Der *Pseudomonas*-Stamm AFT 21, dessen proteolytische Enzymaktivität STEPANIAK und FOX (1985) untersuchten, bildete drei verschiedene Proteinasen, ein *Serratia marcescens*-Stamm zwei (MITCHELL et al., 1986). Bei einem *Alcaligenes*-Stamm trennten ZABORNIAK und KNAUT (1984) zwei proteolytische Enzymfraktionen. Nach HAMPSON et al. (1963) bildet *Proteus mirabilis* nur eine Proteinase, *Proteus vulgaris* dagegen offenbar zwei.

EXTERKATE (1975, 1976) fand bei verschiedenen *Streptococcus cremoris*-Stämmen bis zu drei unterschiedliche zellwandgebundene Proteinaseaktivitäten, wobei aber nicht klar ist, ob diese Aktivitäten verschiedenen Konformationen ein und desselben Enzyms oder unterschiedlichen Enzymen zuzuordnen sind. Ebenfalls bei einem *Streptococcus cremoris*-Stamm wiesen GEIS et al. (1985) eine einzelne zellwandgebundene Proteinase nach.

Ein von FURUKAWA et al. (1968) untersuchter *Bacillus cereus*-Stamm produzierte drei verschiedene proteolytische Enzyme, CHOPRA und MATHUR (1985) trennten zwei Proteinasefraktionen eines *Bacillus stearothermophilus*-Stammes.

2.2.4 Biochemische Eigenschaften bakterieller Proteinasen

Die Mehrzahl der mikrobiellen proteolytischen Enzyme sind Endopeptidasen (MATSUBARA und FEDER, 1971), und die meisten dieser mikrobiellen Proteinasen können nach HARTLEY (1960) entsprechend dem Mechanismus der Katalyse, d.h. nach den reaktiven Gruppen des aktiven Zentrums, in vier Klassen eingeteilt werden: Serin-Proteinasen, Thiol-Proteinasen, Metalloproteinasen und "saure" Proteinasen; weitere Unterteilungen in "alkalische" oder "neutrale" Proteinasen richten sich nach dem pH-Optimum für die Hydrolyse von Casein (MORIHARA, 1974). Neutrale Metalloproteinasen sind bei Bakterien weit verbreitet (MATSUBARA und FEDER, 1971), zusammen mit alkalischen Serinproteinasen (MORIHARA, 1974). Thiol-Proteinasen besitzen offenbar nur wenige Keime, wie *Clostridium histolyticum* ("Clostripain") und A-Streptokokken (MORIHARA, 1974), "saure" Proteinasen finden sich bei Schimmelpilzen, selten bei Bakterien (MATSUBARA und FEDER, 1971).

Die Proteinasen von *Pseudomonas* species gehören im allgemeinen zur Gruppe der neutralen Metalloproteinasen (FAIRBAIRN und LAW, 1986) und zeichnen sich deshalb durch eine Spezifität für hydrophobe oder "sperrige" Aminosäurereste auf der Amino-Seite der zu spaltenden Peptidbindung aus (MORIYAMA, 1974).

Voraussetzung für die Aktivität und Stabilität der Metalloproteinasen ist die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen. Deshalb verlieren sie ihre Aktivität, wenn sie gegen den Chelatbildner EDTA dialysiert werden. Ihre Apoenzyme werden im allgemeinen durch Zn^{2+} , Ca^{2+} und Co^{2+} aktiviert, obwohl hohe Konzentrationen dieser und anderer Metallionen hemmend wirken. Ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Inhibitor o-Phenanthrolin weist auf die Notwendigkeit von Zink für die Enzymaktivität hin. Letzteres ist ein wesentlicher Bestandteil vieler Proteinase, wobei 1 Enzymmolekül 1 Zinkatom enthält, oft zusammen mit Calcium, das für die Integrität des aktiven Zentrums mit verantwortlich ist (FAIRBAIRN und LAW, 1986).

Einige wichtige Eigenschaften verschiedener bakterieller Proteinase gibt Tabelle 2 wieder.

2.2.5 Hitzeresistenz bakterieller Proteinase

Die meisten globulären Proteine werden bei Temperaturen von 50–70 °C denaturiert. Eine wesentliche Folge der Denaturierung ist in der Regel der Verlust der charakteristischen biologischen Aktivität, bei Enzymen also der Verlust der katalytischen Fähigkeit. Jedoch sind schon lange auch Enzyme bekannt, die hitzeresistent sind. Man findet sie besonders bei thermophilen Mikroorganismen (CHRISTOPHERSEN, 1980). So blieben nach 30-minütiger Erhitzung bei 70 °C 87,5 % der Proteinaseaktivität eines *Bacillus stearothermophilus*-Stammes erhalten (CHOPRA und MATHUR, 1984). Neben den das Wachstumsoptimum bei höheren Temperaturen besitzenden Mikroorganismen, die dementsprechend resistenter Enzyme benötigen, gibt es auch extrem hitzeresistente Enzyme bei nicht-thermophilen psychrotrophen Bakterien (CHRISTOPHERSEN, 1980).

Einen Hinweis auf die außerordentliche Hitzestabilität bakterieller Proteinase fand KRAUS (1960b), als er unter sterilen Kautelen die um Proteolytenkulturen auf Calcium-Caseinpeptonagar nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958) ausgebildeten Aufhellungshöfe herauschnitt und sie in steriler Magermilch erhitzte; es

Tabelle 2: Herkunft und Eigenschaften bakterieller Proteinasen

HERKUNFT				EIGENSCHAFTEN					
Bakterienstamm	psychro-troph. Keim?	Keim isoliert aus	Zahl der produzierten Proteinasen	Molekular-gewicht	Tem-pera-tur-opt.	pH-Opt.	Enzym-klas-sifi-kation	Hitze-stabi-lität: D-Werte ⁴	Autor(en)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> "P 26"	+	"gekühlten Lebensmitteln"	1	23 000	21°C	7,5	K.A. ²	D(62,8°C) = 840 min	MAYERHOFER et al. (1973)
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	K.A.	Abwasser	1	35 000	K.A.	10,0	alkal. Serin-prot. ³	(kein D-Wert)	BOETHLING (1975)
<i>Pseudomonas</i> sp. "MC 60"	+	Rohmilch	1	48 000	45°C	7-8	neutr. Metallo-prot.	D(72°C) ≈ 330 min D(149°C) = 1,5 min	ADAMS et al. (1975); BARACH et al. (1976b)
<i>Pseudomonas</i> sp. "Nr. 4"	+	Rohmilch	1	44 000	40°C	7,2	K.A.	(kein D-Wert)	GEBRE-EGZIAHHER et al. (1980a)
<i>Pseudomonas</i> sp. "Nr. 22"	+	Rohmilch	1	46 000	40°C	6,0	K.A.	D(121°C) = 10 min	
<i>Pseudomonas</i> sp. "Nr. 23"	+	Rohmilch	1	44 000	40°C	6,5	K.A.	D(121°C) ≈ 6 min	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> "T 16"	+	Rohmilch	1	38 000 bzw. 38 900 ± 2 000	40-45°C	7,3-7,5	neutr. Metallo-prot.	D(120°C) ≈ 10 min	PATEL et al. (1983a, 1983b)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> "T 25"	+	Rohmilch	1	41 500 bzw. 42 000 ± 1 500	40°C	7,2-7,4	neutr. Metallo-prot.	(kein D-Wert)	JACKMAN et al. (1983); PATEL et al. (1983a)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	K.A.	K.A.	1	K.A.	52-55°C	7,4	K.A.	K.A.	KROLI. und KLOSTERMEYER (1984)
<i>Pseudomonas</i> sp. "AFT 21"	+	Rohmilch	3 Prot. I	46 200	45-47,5°C	7-7,5	neutr. Metallo-prot.	D(140°C) = 1,15min	STEPANIAK und FOX (1985)
			Prot. II	47 000	45-47,5°C	7-7,5	neutr. Metallo-prot.	D(140°C) = 0,9 min	
			Prot. III	46 200	45-47,5°C	8,5	alkal. Metallo-prot.	D(140°C) = 1,33min	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> "LY 13"	+	Rohmilch	1	45 000	K.A.	7,0	neutr. Metallo-prot.	(kein D-Wert)	YAN et al. (1985)
<i>Alcaligenes</i> sp. "T. 186"	K.A.	K.A.	2 proteolytische Fraktionen	108 000 bzw. 48 000	37°C	7,3* und 8,2*	K.A.	D(63°C) ≈ 30 min	ZABORNIK und KNAUT (1984)

Tabelle 2 (Fortsetzung):

HERKUNFT				EIGENSCHAFTEN					
Bakterienstamm	psychro-troph. Keim?	Keim isoliert aus	Zahl der produzierten Proteinasen	Molekular-gewicht	Tem-peratur-opt.	pH-Opt.	Enzym-klas-sifi-kation	Hitze-stabi-lität: D-Werte	Autor(en)
<i>Serratia marcescens</i> "OM 119"	+	Rohmilch	2 Prot. I Prot. II	51 000 51 000	45°C 37°C	8,3 7,7	alkal. Metal-lo-prot. alkal. Metal-lo-prot.	D(74°C) = 13 min D(140°C) = 0,25min D(74°C) = 5,5 min D(140°C) = 0,03min	MITCHELL et al. (1986)
" <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> "	K.A.	K.A.	1 ("Thermolysin")	37 500	K.A.	7-9	Metal-lo-prot.	(kein D-Wert)	MATSUBARA und FEDER (1971)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> "RM-67"	K.A.	Rohmilch	2 Prot. I Prot. II	67 610 19 950	70°C 70°C	8,0 8,0	Prot. I Metal-lo-prot.	(kein D-Wert)	CHOPRA und MATHUR (1985)
<i>Bacillus coagulans</i> "LY 9"	+	Rohmilch	1 offenbar als Polymer: Monomer Polymer	33 500 420 000	K.A.	7,5	neutr. Metal-lo-prot.	D(63°C) ≈ 30 min	YAN et al. (1985)
<i>Bacillus subtilis</i> "LY 11"	+	Rohmilch	1	39 000	K.A.	7,0	neutr. Metal-lo-prot.	(kein D-Wert)	
<i>Bacillus</i> sp. "LY 10"	+	Rohmilch	1	37 000	K.A.	6,5	neutr. Metal-lo-prot.	D(63°C) ≈ 15 min	
<i>Staphylococcus aureus</i> "M 135"	K.A.	"vom Menschen"	1	29 000	K.A.	7,5-8,3	alkal. Metal-lo-prot.	K.A.	HASCHE et al. (1977)
<i>Streptococcus cremoris</i> "AC1"	K.A.	mesoph. Starter-kultur	1 (zellwandgeb.)	145 000	30°C bzw. 54°C	5,5-6,0	Serin-prot.	K.A.	GEIS et al. (1985)

- Anmerkungen:
- 1) Hitzestabilität siehe unter Punkt 2.2.5
 - 2) K.A. = keine Angaben
 - 3) Prot. = Proteinase
 - 4) Werte für das Gemisch beider Enzyme
 - 5) 30°C für das zellwandgebundene, 40°C für das gelöste Enzym

zeigte sich, daß die Proteinasen je eines Stammes von *Pseudomonas aeruginosa*, "*Pseudomonas fluorescens liquefaciens*" und eines aeroben Sporenbildners auch nach der Einwirkung von 85 °C für 120 s noch wirksam waren. WILLIAMSON et al. (1964) zeigten, daß ein *Streptococcus lactis*-Stamm ein extrazelluläres Enzym produzierte, das nur 32 % seiner Aktivität einbüßte, wenn die "Enzymsuspension" bei 98 °C 1 h lang in Pufferlösung erhitzt wurde. MAYERHOFER et al. (1971) erhitzen die zellfreien Filtrate von Bouillonkulturen "psychrophiler" proteolytischer Bakterien und fanden von *Pseudomonas* spp. produzierte Enzyme, die auch nach einer 30-minütigen Erhitzung auf 62,8 °C aktiv blieben. Ein Enzym eines *Pseudomonas fluorescens*-Stammes wurde bei 62,8 °C erst nach 16 h inaktiviert, bei 71,4 °C nach 8,5 h und bei 121 °C nach 9 min. Jedoch wurde das Enzym durch Magermilch, Molke und 2,5%ige Caseinlösung vor einer Hitzeinaktivierung weitgehend geschützt. Einen die Hitzeresistenz erhöhenden Effekt der Milch stellten auch BARACH et al. (1976a) und CHRISTOPHERSEN (1980) bei *Pseudomonas fluorescens*-Proteinase fest. Die stabilisierende Wirkung geht nach BARACH et al. (1976b) allerdings nicht von den Milchproteinen, sondern von Ca^{2+} aus. ADAMS et al. (1975) fanden, daß alle von ihnen aus roher Magermilch isolierten, Lackmusmilch schnell proteolysierenden psychrotrophen Bakterien der Gattung *Pseudomonas* angehörten. Alle produzierten Proteinase, die eine Erhitzung bei 149 °C für 10 s überstanden. Die als Modell gewählte Proteinase des Stammes MC 60 hatte einen $D_{149^\circ\text{C}}$ -Wert von 1,5 min; ihre Aktivität war somit bei 149 °C über 4000mal resistenter als Sporen von *Bacillus stearothermophilus*. ADAMS et al. (1975) kommen zu dem Schluß, daß eine Hitzebehandlung bei 149 °C für 4 s zwar die Milch sterilisieren, aber nur weniger als 10 % der Proteinase zerstören würde. Eine Wärmebehandlung, die eine thermische Inaktivierung hitzeresistenter Proteinase bewirkt, brächte starke Veränderungen der Milch mit sich.

ZABORNIK und KNAUT (1984) wiesen bei ungereinigten *Alcaligenes*-Proteinase eine pH-Wert-Abhängigkeit der Hitzeresistenz nach: Während bei pH 7,3 die Erhitzung auf 100 °C (5 min und 10 min) eine völlige Inaktivierung zur Folge hatte, wiesen die untersuchten Proteinase bei pH 8,2 nach denselben Zeiten und bei derselben Temperatur noch Restaktivität auf. Eine bei 63 °C für 30 min durchgeführte Erhitzung bewirkte bei pH 7,3 eine 92%ige, bei pH 8,2 eine 85%ige Erniedrigung der proteolytischen Aktivität.

Auch die Bebrütungstemperatur, bei der Proteolyten angezüchtet werden, scheint

von Einfluß auf die spätere Enzymresistenz zu sein. So zeigten LEINMÜLLER und CHRISTOPHERSEN (1982), daß ein *Pseudomonas fluorescens*-Stamm, der bei 4 °C inkubiert wurde, hitzeresistentere Proteinasen produzierte, als wenn er bei 25 °C kultiviert wurde.

Interessanterweise haben die hitzestabilen bakteriellen Proteinasen im Bereich von ca. 50 °C ein Resistenzminimum, das nach BARACH et al. (1978) unter anderem auf Autolyse zurückzuführen sein soll. Nach KIELWEIN (1975) wurden die Proteinasen von *Pseudomonas fluorescens* im Bereich zwischen 40 °C und 47,5 °C innerhalb von 30 min Erhitzungszeit vollständig inaktiviert. Bei Temperaturen zwischen 50 °C und 105 °C war nach einstündiger Erhitzung und bei einer Temperatur von 150 °C nach einer Einwirkungsdauer von 1 min noch Restaktivität zu ermitteln. Neun von BARACH et al. (1976a) untersuchte Proteinasen aus Rohmilch isolierter psychrophiler Pseudomonaden verloren durch eine 10minütige Erhitzung auf 55 °C über 90 % ihrer Aktivität, während nach ADAMS et al. (1975) acht davon nach einer Erhitzung auf 149 °C für 10 s nur weniger als 30 % der Aktivität einbüßten.

Ähnliche Beobachtungen machten PATEL et al. (1983a) bei *Pseudomonas fluorescens*-Proteinasen. LEINMÜLLER und CHRISTOPHERSEN (1982) konnten nachweisen, daß die hitzeresistenten Enzyme eines *Pseudomonas fluorescens*-Stammes durch 40minütige Erhitzung bei 50 °C weitgehend inaktiviert wurden, und widerlegten die ihrer Meinung nach naheliegende Annahme, daß ein bei 50 °C inaktiviertes Enzym durch Erhitzung auf 70 °C reaktivierbar sein könnte. Im Zusammenhang mit diesem von CHRISTOPHERSEN (1980) als "Temperaturoptimum für den Aktivitätsverlust" bezeichneten Resistenzminimum stellte der Autor fest, daß im Gegensatz zur *Pseudomonas fluorescens*-Proteinase bei den Proteinasen von *Pseudomonas putrefaciens* (jetzt *Alteromonas putrefaciens*, siehe BAUMANN et al., 1984) und *Pseudomonas fragi* keine rasche Inaktivierung im unteren Temperaturbereich erfolgte, vielmehr nahm die Inaktivierungsrate prinzipiell mit steigender Erhitzungstemperatur zu; aber auch bei diesen Enzymen blieb stets eine ausgeprägte, sehr resistente Restaktivität von 10 - 20 % der Ausgangsaktivität erhalten, wenn auf höhere Temperaturen erhitzt wurde. Ursachen und Mechanismen der Hitzestabilität sind noch unbekannt.

2.2.6 Bedeutung der Proteinasen für die Versorgung der Bakterien mit Aminosäuren

Offenbar spielen die Proteinasen eine Rolle bei der Aminosäurenversorgung von proteolytischen Bakterien. Dies soll am Beispiel der Milchsäurestreptokokken skiz-

ziert werden: Bei einigen Stämmen von *Streptococcus lactis* und *Streptococcus cremoris* wurden freie oder zellwandgebundene extrazelluläre Proteinasen nachgewiesen, die Casein zu Peptiden abbauen können (WILLIAMSON et al., 1964; THOMAS et al., 1974; EXTERKATE, 1975; EXTERKATE, 1976; GEIS et al., 1985). Aminosäuren, Di- und Oligopeptide können von den Zellen mit getrennten Transportmechanismen aufgenommen werden (LAW, 1977; LAW, 1978), wobei die Obergrenze für Oligopeptide zwischen drei und sieben Aminosäureresten zu liegen scheint (LAW et al., 1976). Die Peptide werden intrazellulär von Peptidasen zu Aminosäuren hydrolysiert (LAW et al., 1974). Dies kann auch extrazellulär geschehen: So fand LAW (1977) bei *Streptococcus cremoris* freie extrazelluläre Dipeptidasen, bei *Streptococcus lactis* zellwandgebundene Dipeptidaseaktivität. Das Zusammenwirken von (zellwandgebundenen) Proteinasen, von Transportmechanismen für Aminosäuren, Di- und Oligopeptide und von intrazellulären Peptidasen sichert wahrscheinlich die Versorgung von in Milch wachsenden N-Streptokokken mit essentiellen Aminosäuren (LAW, 1978).

2.3 Bedeutung der Proteolyten in Lebensmitteln

In erster Linie sind Proteolyten als Verderbserreger von Bedeutung. Einige Species sind lebensmitteltechnologisch erwünscht, manche Proteolyten gelten auch als Krankheitserreger.

2.3.1 Proteolyten als Verderbserreger

2.3.1.1 Allgemeines

Wenn in einem Lebensmittel irgendwelche Veränderungen eintreten, die seinen Gebrauchswert einschränken, wobei in aller Regel auch die sinnfällige Beschaffenheit – Aussehen, Konsistenz, Geruch, Geschmack – deutlich verändert wird, spricht man von Verderb (SINELL, 1985). Eine von mehreren möglichen Verderbsursachen ist die mikrobielle Proteolyse, die eine Vielfalt von Geruchs- und Geschmacksfehlern zur Folge haben kann (LEE, 1976).

Die Bedeutung der mikrobiellen Proteolyse für den Verderb ist abhängig von der Art des Nahrungsmittels.

2.3.1.2 Verderb von Fisch und Fleisch

Der Verderb von Fisch ist gewöhnlich gekennzeichnet durch die Anreicherung basischer Stickstoffverbindungen wie Trimethylamin (LERKE et al., 1967; PRIEBE, 1984) und Ammoniak (PRIEBE, 1984), beim Verderb von Fleisch werden Ammoniak, Schwefelwasserstoff, Indol und andere faulig riechende Verbindungen frei (JAY und KONTOU, 1967). Einige Untersuchungen zeigen, daß ein derartiger Verderb bereits vor dem Einsetzen einer deutlichen bakteriellen Proteolyse beginnt (JAY und KONTOU, 1967; LERKE et al., 1967; TARRANT et al., 1971; DAINTY et al., 1975; KARNOP, 1982b), aber auch bakteriell bedingt ist. So stellten DAINTY et al. (1975) in Experimenten mit Reinkulturen, die aus verdorbenem bzw. vakuumverpacktem Rindfleisch isoliert worden waren, fest, daß *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., "*Enterobacter liquefaciens*" (jetzt *Serratia liquefaciens*, siehe RICHARD, 1984) und "*Microbacterium thermosphactum*" (jetzt *Brochothrix thermosphacta*, siehe SNEATH und JONES, 1986) jeweils Verderbsgerüche während der Lagerung erzeugten, obwohl nur die ersten beiden wahrnehmbare Proteinveränderungen hervorriefen. Die den Verderb kennzeichnenden mikrobiellen Stoffwechselprodukte entstehen offenbar aus freien Aminosäuren (JAY und KONTOU, 1967) und anderen niedermolekularen Verbindungen (JAY und KONTOU, 1967; LERKE et al., 1967).

LERKE et al. (1967) teilten Fischmuskelpreßsaft in eine Protein- und eine Nichtproteinfraktion und beimpften sie mit einem aus verderbendem Fisch isolierten *Pseudomonas*-Stamm. Während die Proteinfraktion keinerlei Verderbserscheinungen zeigte, verdarb die proteinfreie Fraktion. Der Verderb wurde organoleptisch anhand von Aussehen und Geruch sowie chemisch anhand der Bestimmung der "volatile reducing substances", des flüchtigen Gesamtstickstoffs und des Trimethylaminstickstoffs bestimmt. Wenn beide Fraktionen des Fischmuskelpreßsafts vereinigt wurden, lief der Verderb schneller ab, als bei der Nichtproteinfraktion allein. Die bakterielle Proteolyse, bestimmt anhand der Gehalte an Gesamtstickstoff und Proteinstickstoff, war im nichtfraktionierten Saft größer als in der Proteinfraktion.

Hinsichtlich des Fleischverderbs führten TARRANT et al. (1971) sowie DAINTY et al. (1975) Untersuchungen durch. TARRANT et al. (1971) beimpften "aseptisch" entnommene Schweinefleischproben mit einer Reinkultur von *Pseudomonas fragi*. Dabei war ein nennenswerter Proteinabbau erst zu beobachten, nachdem

das Fleisch als verdorben beurteilt worden war. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen DAINY et al. (1975), die bei natürlich kontaminiertem Rindfleisch vor dem Erscheinen von Verderbsgeruch und Oberflächenschleim elektrophoretisch keine Proteolyse nachweisen konnten. Erst mehrere Tage nachdem das Fleisch bereits verdorben war, wurde eine Hydrolyse sowohl des sarkoplasmatischen als auch des myofibrillären Proteins festgestellt. Ein Vergleich der elektrophoretischen Muster der Proteine von sterilem und nicht sterilem Rindfleisch nach der Lagerung zeigte, daß die nach Einsetzen des Verderbs feststellbare Proteolyse auf bakterielle Aktivität zurückzuführen war.

2.3.1.3 Verderb von Milch und Milchprodukten

2.3.1.3.1 Allgemeines

Milch ist für viele Mikroorganismen ein ausgezeichnetes Kulturmedium, da sie einen hohen Wassergehalt und einen nahezu neutralen pH-Wert hat und reich an Nährstoffen ist (FRAZIER und WESTHOFF, 1978b). Einige in frisch ermolkenen Milch vorhandene antimikrobielle Prinzipien wie das Laktoperoxidase-System oder Agglutinine sind in der Regel nur gegenüber bestimmten Keimen aktiv (WALSTRA und JENNESS, 1984) und verlieren auch rasch an Wirksamkeit (FRAZIER und WESTHOFF, 1978b).

Von Hand ermolkene und ungekühlte Rohmilch wird gewöhnlich durch die Aktivität von Milchsäurebakterien sauer (BLAU und KIELWEIN, 1985). Bei maschinell ermolkenen Milch tritt die Kontamination durch die gramnegativen Stäbchenbakterien der "Melkmaschinenflora" in den Vordergrund, deren Anteil am Gesamtkeimgehalt der frisch ermolkenen Milch nach KURZWEIL und BUSSE (1973) um so höher liegt, je höher die Keimzahl ist. Durch die Milchkühlung wird zwar die Säuerung unterbunden, damit entfällt aber die Hemmwirkung der Milchsäurebakterien auf gramnegative Keime. Da letztere in der Regel psychrotroph sind (siehe hierzu Abschnitt 2.3.1.3.4, Seite 20), werden diese von den Milchgerätschaften stammenden Bakterien durch die Kühlagerung im Wachstum begünstigt und verursachen durch die Hydrolyse von Milchfett und -protein oft Geschmacksfehler wie unrein, fruchtig, ranzig, bitter etc. (TOLLE, 1979). Die psychrotrophen gramnegativen Bakterien der Rohmilch sind zwar keine thermotoleranten Keime, aber viele Species produzieren hitzeresistente Proteinasen und Lipasen, die auch in hitzebehandelter Milch bzw. Milchprodukten noch Milchinhalts-

stoffe abbauen können (LAW, 1979). (Zur Hitzeresistenz der bakteriellen Proteinase siehe Abschnitt 2.2.5, S. 9). Außerdem spielen psychrotrophe gramnegative Stäbchenbakterien - vor allem Pseudomonaden - eine entscheidende Rolle als Rekontaminanten von pasteurisierter Milch (TOLLE, 1979).

Es ist unumstritten, daß der Verderb von Milch und Milchprodukten bei Ausschluß der Säuerung nicht, wie bei Fisch und Fleisch, allein schon durch den mikrobiellen Abbau niedermolekularer Verbindungen einsetzt. Es findet vielmehr unter günstigen Bedingungen von Anfang an eine massive Proteolyse statt: So stellten LAW et al. (1977) bei Rohmilch, die mit einem *Pseudomonas fluorescens*-Stamm in realistischer Keimdichte beimpft und drei Tage bei 7,5 °C gelagert worden war, bereits einen deutlichen Abbau von κ - und β -Casein fest.

Diese Hydrolyse von Milchproteinen wird gewöhnlich von der Entwicklung eines bitteren Geschmacks begleitet (MAYERHOFER et al., 1973; WHITE und MARSHALL, 1973; ADAMS et al., 1975; McKELLAR, 1981; TORRIE et al., 1983; KNAUT und ZABORNIK, 1984; KROLL und KLOSTERMEYER, 1984), der durch einige der freigesetzten Peptide zustande kommt (FRAZIER und WESTHOFF, 1978b). Voraussetzung für den Bittergeschmack von Peptiden ist die Hydrophobität des Gesamtmoleküls und eine bestimmte sterische Anordnung einer polaren und einer hydrophoben Gruppe, wodurch eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem Rezeptor ermöglicht wird (WIESER und BELITZ, 1976). Das gleiche Strukturprinzip ist auch die Ursache des bitteren Geschmacks vieler L-Aminosäuren, wie L-Arginin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Tyrosin und L-Valin (WIESER und BELITZ, 1975). Die Bildung von Bitterpeptiden ist in erster Linie an eine bestimmte Zusammensetzung der Proteine gebunden, die Art der spaltenden Proteinase spielt dagegen eine untergeordnete Rolle. Casein liefert besonders bittere Hydrolyseprodukte (PETRITSCHKE et al., 1972).

FRAZIER und WESTHOFF (1978b) unterscheiden fünf Arten von Veränderungen, die durch proteolytische Mikroorganismen hervorgerufen werden können:

- a) Saure Proteolyse, d.h. Säureproduktion und Proteolyse kommen zusammen vor.
- b) Proteolyse mit geringer Säureproduktion oder gar Produktion alkalischer Stoffwechselprodukte.

- c) Süßgerinnung, die durch renninartige Enzyme von Bakterien in einem frühen Stadium der Proteolyse verursacht wird.
- d) Langsame Proteolyse durch intrazelluläre Enzyme von Bakterien nach deren Autolyse, die gewöhnlich in Milch ohne Bedeutung ist, aber solche erlangt, wenn die Enzyme für ihre Tätigkeit viel Zeit haben, wie im reifenden Käse oder in Produkten mit langer Haltbarkeit.
- e) Eiweißabbau durch die erhalten gebliebene proteolytische Aktivität von hitzestabilen Proteinasen.

Kuhmilch enthält etwa 3,5 % Proteine; ca. 2,8 % davon entfallen auf die Caseine, 0,7 % auf die Molkenproteine (MABBITT, 1981). Die in der Milch vorliegenden Eiweiße werden von proteolytischen Bakterien unterschiedlich hydrolysiert. Auf jeden Fall werden die Caseine abgebaut, wenn auch die Angaben über die abgebauten Caseinfraktionen auseinandergehen. Darüber, ob auch die Molkenproteine angegriffen werden, liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor.

2.3.1.3.2 Abbau der Caseine

Die Caseine wurden ursprünglich aufgrund ihres elektrophoretischen Verhaltens in die drei Fraktionen α -, β - bzw. γ -Casein unterteilt. Spätere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß sich der α -Casein-Komplex aus Calcium-empfindlichem α_s -Casein und Calcium-unempfindlichem κ -Casein zusammensetzt (BRUNNER et al., 1960). Die α_s -Fraktion wiederum besteht aus einer Hauptkomponente, dem α_{s1} -Casein, und mehreren kleineren Komponenten (WHITNEY et al., 1976).

Die einzelnen Caseinfraktionen werden von Proteolyten mit unterschiedlicher Intensität angegriffen. Besonders empfindlich scheint, unabhängig von der proteolytisch aktiven Species, das κ -Casein zu sein, gefolgt vom β -Casein.

So inokulierten LAW et al. (1977) Rohmilch mit einem *Pseudomonas fluorescens*-Stamm und unterzogen sie nach dreitägiger Kühlagerung einer Ultrahocherhitzung. Nach 10-14 Tagen Lagerung bei 20 °C gelierten diese Milchproben. Dabei zeigte sich, daß die von dem *Pseudomonas fluorescens*-Stamm produzierte Protease κ -Casein am intensivsten angriff, und zwar unter Bildung von Para- κ -Casein, gefolgt von β -Casein, α_{s1} -Casein und Para- κ -Casein. Der Abbau von κ - und β -Casein war bereits unmittelbar nach der Erhitzung festzustellen. Nach 14

Tagen, nach dem Gelieren der Milch, war K -Casein nicht mehr nachweisbar, β -Casein zu 78 % und α_{s1} -Casein zu 22 % verschwunden. Auch GEBRE-EGZIABHER et al. (1980b) stellten in roher Magermilch, die mit psychrotrophen, aus Rohmilch isolierten *Pseudomonaden* inokuliert worden war, einen bevorzugten Abbau von K -Casein durch die Proteinasen der *Pseudomonaden* fest. Erste Anzeichen des Proteinabbaus waren schon nach dreitägiger Kühlagerung der Milch bei Keimzahlen von $1,8 \times 10^6$ - $9,5 \times 10^6$ /ml zu erkennen. SINGH und SHARMA (1983) beimpften 1%ige Lösungen von gereinigtem α_s -, β - und K -Casein mit "stark proteolytischen" Kulturen von *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus bulgaricus*; beide Kulturen bauten K -Casein schneller ab als α_s - oder β -Casein. In Experimenten mit ungereinigten *Pseudomonas fluorescens*-Proteinasen registrierten auch KNAUT und ZABORNIK (1984), daß K -Casein, zusammen mit γ -Casein, am schnellsten abgebaut wird, in zweiter Linie das β -Casein, dann das α_s -Casein. Allerdings finden sich im Schrifttum auch hierzu kontroverse Berichte. So konnten COUSIN und MARTH (1977) keinen Abbau von K -Casein durch aus Rohmilch isolierte psychrotrophe Bakterien feststellen, sondern hauptsächlich von β -Casein. PÜRSCHEL und POLLACK (1972) beobachteten, daß von sieben Stämmen "psychrophiler" Bakterien sechs die β -Casein-Fraktion stärker angriffen als das α -Casein. Nach KIELWEIN (1975) wird durch die Proteinasen von *Pseudomonas fluorescens* innerhalb der Caseine die α_s -Fraktion bevorzugt gespalten.

2.3.1.3.3 Abbau der Molkenproteine

DeBEUKELAR et al. (1975) konnten chromatographisch keinen Abbau von Molkenproteinen durch eine ausgewählte Kultur eines psychrotrophen, Casein spaltenden Mikroorganismus nachweisen. Auch COUSIN und MARTH (1977) stellten fest, daß die Molkenproteine von aus Rohmilch isolierten psychrotrophen Bakterien (*Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp. und *Lactobacillus* spp.) nicht angegriffen wurden. LAW et al. (1977) konnten während einer 8-wöchigen Lagerperiode bei Zimmertemperatur in ultrahoherhitzter Milch, die vor der Hitzebehandlung drei Tage bei 7,5 °C gelagert worden war und zuletzt pro ml 5×10^7 koloniebildende Einheiten eines zugesetzten psychrotrophen *Pseudomonas fluorescens*-Stammes enthalten hatte, keine Proteolyse von Molkenproteinen nachweisen.

Dagegen wird nach KIELWEIN (1975) durch die Proteinasen von *Pseudomonas*

fluorescens innerhalb der Molkenproteine das β -Laktoglobulin bevorzugt gespalten. Auch GEBRE-EGZIBHER et al. (1980b) stellten einen Abbau von Molkenproteinen fest. Diese Autoren beimpften rohe Magermilch mit psychrotrophen, aus Rohmilch isolierten *Pseudomonaden* und lagerten sie bei 7 °C. Es zeigte sich, daß die Molkenproteine weniger angegriffen wurden als die Caseine, wobei fünf der sechs Testorganismen β -Laktoglobulin in größerem Umfang abbauten als α -Laktalbumin; drei der Testorganismen bauten die Molkenproteine in beträchtlichem Ausmaß ab, und zwar α -Laktalbumin bis zu 35 % und β -Laktoglobulin bis zu 42%. Ähnliche Beobachtungen machten KNAUT und ZABORNIK (1984) mit ungereinigten *Pseudomonas fluorescens*-Proteinasen.

2.3.1.3.4 Psychrotrophe Proteolyten der Milch

Rohmilch wird heute in der Regel unmittelbar nach dem Melken rasch gekühlt und dann bei Kühltemperaturen gelagert. Mit der Einführung des Maschinenmelkens (BLAU und KIELWEIN, 1985) und der Milchkühlung (MUIR und PHILLIPS, 1984) hat sich die Mikroflora der Rohmilch verändert und besteht nun hauptsächlich aus psychrotrophen gramnegativen Bakterien (MUIR und PHILLIPS, 1984). Unter Psychrotrophen versteht man solche Mikroorganismen, die sich – unabhängig von ihrer optimalen Wachstumstemperatur – bei einer Temperatur von 7 °C oder weniger noch vermehren können (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1969). Es hat sich gezeigt, daß Wachstum und Stoffwechselaktivität der Psychrotrophen im Hinblick auf Qualität und Haltbarkeit der Milch wichtiger sind als die Höhe der Gesamtkeimzahl. Viele psychrotrophe Mikroorganismen produzieren proteolytische und/oder lipolytische Enzyme. Diese Enzyme können die Pasteurisierung und andere Hitzebehandlungen überstehen und in Milch und Milchprodukten aktiv bleiben (COUSIN, 1981). (Zur Hitzeresistenz der Proteinasen siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 9).

Unter den proteolytischen Psychrotrophen der Milch ist die Gattung *Pseudomonas* am häufigsten vertreten. So stellten z.B. WHITE et al. (1978) fest, daß in 55 von 57 Proben, welche Mikroorganismen enthielten, die nach 7 Tagen bei 4 °C Proteolyse erkennen ließen, *Pseudomonas* spp. dominierten. Von den Species dieses Genus gilt *Pseudomonas fluorescens* als die häufigste, was allerdings nach LAW (1979) eher auf ihre einfache Identifizierung als auf ihre tatsächliche Verbreitung zurückzuführen sein dürfte. In Tabelle 3 (Seite 22) sind weitere Bak-

terienfamilien und -gattungen aufgeführt, von denen psychrotrophe Stämme aus Milch isoliert worden sind, bei denen Proteolyse nachgewiesen wurde oder deren Verderbsart auf proteolytische Aktivität hinweist.

Fast alle von LAW et al. (1979) aus Rohmilch isolierten proteolytischen Psychrotrophen zeigten, abgesehen von einigen *Pseudomonas fluorescens*-Stämmen, auch Lipolyse. Die höchsten lipolytischen und proteolytischen Aktivitäten fanden sich bei *Pseudomonaden*.

GROSSKOPF und HARPER (1969) befaßten sich erstmals mit dem Problem der psychrotrophen Sporenbildner in pasteurisierter Milch. Seither wurden aus Milch eine Vielzahl von *Bacillus* spp. isoliert, die sich bei Kühlungstemperaturen vermehren konnten (siehe Tabelle 4, Seite 23). Zwar wird bei GROSSKOPF und HARPER (1969) wie auch in den meisten späteren Veröffentlichungen nicht der Nachweis von proteolytischen Eigenschaften dieser Keime geführt bzw. weist der beschriebene Verderb nicht eindeutig auf Proteolyse hin, doch sollen nach FRAZIER und WESTHOFF (1978a) viele Species der Gattung *Bacillus* proteolytische Fähigkeiten besitzen. Auch die bei psychrotrophen *Bacillus cereus*-Stämmen beschriebene Süßgerinnung (OVERCAST und ATMARAM, 1974) läßt auf proteolytische Eigenschaften schließen. Ähnliches gilt auch für anaerob wachsende Sporenbildner. BHADSAVLE et al. (1972) fanden in Rohmilch Clostridien, die eine minimale Wachstumstemperatur von 4 °C bzw. 0 °C hatten und als *Clostridium hastiforme* bzw. *Clostridium carnis* identifiziert wurden. Ein *Clostridium hastiforme*-Stamm verdarb Milch in einer Weise (fauliger Geruch), die für Proteolyse spricht.

Nichtsporenbildende gramnegative Psychrotrophe vermehren sich bei Kühltemperaturen schneller als die meisten psychrotrophen Sporenbildner. So betrugen z.B. nach LANGEVELD et al. (1973) die Verdopplungszeiten von fünf psychrotrophen *Bacillus circulans*-Stämmen in Milch bei 5 °C etwa 12 h, die von zwei psychrotrophen *Pseudomonas*-Stämmen etwa 5,5 h. Bei der Verminderung der Haltbarkeit frischer Milchprodukte und pasteurisierter Milch scheinen daher die gramnegativen Psychrotrophen die größere Rolle zu spielen (COLLINS, 1981).

Tabelle 3: Aus Milch isolierte psychrotrophe Proteolyten
(außer Pseudomonas)

Familie	Gattung	Autor(en)
Pseudomonadaceae	Xanthomonas	LAW et al. (1979) O'CONNOR et al. (1986)
Neisseriaceae	Acinetobacter	LAW et al. (1979)
(Weitere gramnegative aerobe Stäbchen und Kokken)	Flavobacterium	COUSIN und MARTH (1977) MUIR et al. (1979) KROLL et al. (1984)
	Alcaligenes	MUIR et al. (1979)
	"Achromobacter" ¹	DeBEUKELAR et al. (1977)
	Cytophaga ²	LAW et al. (1979)
Enterobacteriaceae	Escherichia	WHITE et al. (1978) JUVEN et al. (1981)
	Citrobacter	JUVEN et al. (1981)
	Klebsiella	JUVEN et al. (1981)
	Enterobacter	JUVEN et al. (1981)
	Serratia	JUVEN et al. (1979, 1981) KROLL et al. (1984) MITCHELL et al. (1986)
	Proteus	LAW et al. (1979)
Vibrionaceae	Aeromonas	LAW et al. (1979)
(Weitere fakultativ anaerobe gramnegative Stäbchen)	Chromobacterium	MUIR et al. (1979)
Micrococcaceae	Micrococcus	COUSIN und MARTH (1977) DeBEUKELAR et al. (1977)
(Weitere grampositive Kokken)	Streptococcus Lancefield-Gruppe D ³	KROLL et al. (1984)
(Grampositive Stäbchen)	Bacillus	OVERCAST und ATMARAM (1974) WASHAM et al. (1977) WHITE et al. (1978)
	Clostridium	BHADSAVLE et al. (1972)
	Lactobacillus	COUSIN und MARTH (1977)
		DeBEUKELAR et al. (1977)

Anmerkungen: ¹⁾ Vergleiche Anmerkung 2 zu Tabelle 1 (Seite 3)

²⁾ Vergleiche Anmerkung 3 zu Tabelle 1

³⁾ Vergleiche Anmerkung 4 zu Tabelle 1

Tabelle 4: Aus Milch isolierte psychrotrophe Bazillen

Species	Autor(en)
Bacillus subtilis	SHEHATA und COLLINS (1971) GROSSKOPF und HARPER (1974) WASHAM et al. (1977)
Bacillus pumilus	SHEHATA und COLLINS (1971) GROSSKOPF und HARPER (1974)
Bacillus licheniformis	GROSSKOPF und HARPER (1969) SHEHATA und COLLINS (1971) GROSSKOPF und HARPER (1974)
Bacillus cereus	GROSSKOPF und HARPER (1969) SHEHATA und COLLINS (1971) GROSSKOPF und HARPER (1974) OVERCAST und ATMARAM (1974) WASHAM et al. (1977)
Bacillus megaterium	SHEHATA und COLLINS (1971) GROSSKOPF und HARPER (1974)
Bacillus polymyxa	SHEHATA und COLLINS (1971) WASHAM et al. (1977)
Bacillus macerans	SHEHATA und COLLINS (1971) GROSSKOPF und HARPER (1974) WASHAM et al. (1977)
Bacillus circulans	SHEHATA und COLLINS (1971) GROSSKOPF und HARPER (1974)
Bacillus coagulans	GROSSKOPF und HARPER (1969) SHEHATA und COLLINS (1971) GROSSKOPF und HARPER (1974)
Bacillus laterosporus	SHEHATA und COLLINS (1971) WASHAM et al. (1977)
Bacillus brevis	SHEHATA und COLLINS (1971)
Bacillus sphaericus	WASHAM et al. (1977)
Bacillus lentus	GROSSKOPF und HARPER (1969, 1974) WASHAM et al. (1977)
Bacillus pantothenicus	GROSSKOPF und HARPER (1974)

2.3.1.3.5 Thermodure Proteolyten der Milch

Bakterien, die Pasteurisierungsverfahren überleben können, werden als Thermodure bezeichnet. Eine Zusammenstellung der gewöhnlich als hitzeresistent angesehenen Keime findet sich in Tabelle 5.

Von vielen Species der in Tabelle 5 genannten Gattungen wurden, wie oben ausgeführt, proteolytisch aktive Stämme beschrieben (siehe Abschnitt 2.1, Seite 2 und Tabelle 1, Seite 3). Wesentlich erscheint, daß unter den gramnegativen Bakterien nur *Alcaligenes tolerans* Thermoresistenz besitzt. Bei den übrigen, wie den in diesem Zusammenhang besonders wichtigen *Pseudomonaden*, wird in der Regel davon ausgegangen, daß sie die Pasteurisierung nicht überleben und ihre Anwesenheit in pasteurisierter Milch auf eine Rekontamination nach dem Erhitzungsprozeß zurückzuführen ist (WITTER, 1961). Bei Untersuchungen, denen zufolge *Pseudomonaden* und andere gramnegative Stäbchen Pasteurisierungsverfahren überstehen können, ist zu berücksichtigen, daß durch Pasteurisierungstemperaturen keine vollständige Abtötung aller Keime erreicht wird, sondern, je nach einwirkender Temperatur/Zeit-Kombination, eine Reduktion um eine oder mehrere Zehnerpotenzen erfolgt. Dementsprechend beobachteten z.B. MACAULAY et al. (1963) bei Pasteurisierungsversuchen auch nur dann Überleben von *Pseudomonas*-Stämmen, wenn sehr hohe Ausgangskontaminationen gewählt wurden. Zusammenfassend läßt sich hinsichtlich des Einflusses proteolytischer Aktivitäten auf die Haltbarkeit von hitzebehandelter Milch bzw. daraus hergestellten Produkten sagen, daß diese weniger von der die Hitzebehandlung überlebenden Bakterienflora bestimmt wird, als vielmehr vom Grad der Rekontamination (TOLLE, 1979) und der Aktivität der hitzestabilen proteolytischen Enzyme der Rohmilchflora (LAW, 1979) (siehe Abschnitt 2.2.5, Seite 9).

Tabelle 5: Thermophile Bakterien in Rohmilch
(nach STADHOUDERS et al., 1982)

Genus	Species
Alcaligenes	A. tolerans ¹
Streptococcus	Sc. faecalis ² , Sc. faecium ² , Sc. bovis, Sc. thermophilus
Micrococcus	M. luteus, M. varians
Microbacterium	M. lacticum
Bacillus	B. cereus, B. licheniformis, B. pumilus, B. megaterium, B. circulans, B. subtilis
Clostridium	C. butyricum, C. tyrobutyricum, C. perfringens, C. pseudotetanicum ³ , C. sporogenes

- Anmerkungen: ¹) Nach Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) (1983): *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 19 359.
²) Vergleiche Anmerkung 4 zu Tabelle 1 (Seite 3).
³) Identisch mit *Clostridium butyricum* (CATO et al., 1986).

2.3.2 Lebensmitteltechnologische Bedeutung von Proteolyten

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, daß bei der Reifung von Fleisch und Fleischerzeugnissen es nicht zu einer nennenswerten Proteolyse durch Milchsäurebakterien oder andere Keime kommt (CORETTI, 1958; KÖNEKAMP, 1963; TERPLAN, 1969; REUTER, 1971). Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Arbeiten von JAY und KONTOU (1967), LERKE et al. (1967), TARRANT et al. (1971), DAINY et al. (1975) und KARNOP (1982b) über den Verderb von Fleisch und Fisch (siehe Abschnitt 2.3.1.2, Seite 15).

Dagegen sind proteolytische Aktivitäten von Milchsäurebakterien in Milch (VAN

DER ZANT und NELSON, 1953; BRANDSAETER und NELSON, 1956) und Milchprodukten (TOLLE, 1979) schon lange bekannt, und ein partieller Abbau der Milchproteine bis zu den Aminosäuren ist nach allgemeiner Vorstellung bei Milchprodukten auch erwünscht (TERPLAN und ANGERSBACH, 1972). In Tabelle 6 sind Gattungen und Species von Milchsäurebakterien zusammengestellt, von denen Stämme beschrieben worden sind, die in Milch proteolytische Eigenschaften zeigten.

Milchsäurebakterien geben entweder Proteinase in das Kulturmedium ab, wie dies WILLIAMSON et al. (1964) bei einem *Streptococcus lactis*-Stamm, MILLER und KANDLER (1967a) bei einem *Lactobacillus bulgaricus*-Stamm feststellten, oder sie besitzen zellwandgebundene proteolytische Enzyme. Zellwandgebundene Proteinase wiesen THOMAS et al. (1974) bei *Streptococcus lactis*, EXTERKATE (1975, 1976) und GEIS et al. (1985) bei *Streptococcus cremoris*, EZZAT et al. (1985) bei *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* und *Lactobacillus helveticus* nach. Mit der Existenz zellwandgebundener Proteinase läßt sich auch die Beobachtung von VAN DER ZANT und NELSON (1953) erklären, wonach die zellfreien Kulturmedien von drei proteolytischen *Streptococcus lactis*-Stämmen keine proteolytische Aktivität zeigten.

Bei einigen Käsesorten wirkt sich die proteolytische neben der glycolytischen und lipolytischen Aktivität der als Starterkulturen eingesetzten Milchsäurebakterien auf die erwünschte Textur, das Aussehen und den typischen Geschmack des Produkts aus (TOLLE, 1979). LAW und SHARPE (1978a) vermuten allerdings, daß sich die Rolle der Milchsäurestreptokokken bei der Reifung von Cheddar-Käse darauf beschränkt, die richtigen chemischen Bedingungen (z.B. pH-Wert, Redoxpotential) herzustellen und Ausgangsstoffe für die Geschmacksstoffe bereitzustellen (z.B. freies Methionin für Methanethiol), die dann durch nicht-enzymatische Reaktionen in Geschmacksverbindungen umgesetzt werden. Dafür spricht unter anderem, daß eine der wenigen Verbindungen, deren Konzentration in Cheddar-Käse mit der Geschmacksintensität zusammenhängt, nämlich Methanethiol, von keinem der von LAW und SHARPE (1978b) untersuchten Milchsäurestreptokokken in nennenswerten Mengen produziert wird.

Bei Rohmilchkäse können auch Keime der Rohmilchflora durch ihre proteolytische Aktivität an der Reifung beteiligt sein. So zeigten GALLMANN und PUHAN (1983), daß zwei für Rohmilch-Raclette typische elektrophoretische Fraktionen durch die Hydrolyse von β -Casein durch *Pseudomonas fluorescens* bzw. *Escherichia coli* entstehen.

Tabelle 6: In Milch proteolytisch aktive Milchsäurebakterien

Gattung	Species	Autor(en)
Streptococcus	Sc. lactis	VAN DER ZANT und NELSON (1953) MILLER und KANDLER (1967a, 1967c)
	Sc. cremoris	MILLER und KANDLER (1967a, 1967c)
	Sc. thermophilus	MILLER und KANDLER (1967a, 1967c) SINGH und SHARMA (1983)
Lactobacillus	Lb. lactis	MILLER und KANDLER (1967a, 1967b) SINGH und SHARMA (1983)
	Lb. bulgaricus	MILLER und KANDLER (1967a, 1967b) SINGH und SHARMA (1983)
	Lb. helveticus	MILLER und KANDLER (1967a, 1967b)
	Lb. jugurti ¹	MILLER und KANDLER (1967b)
	Lb. acidophilus	MILLER und KANDLER (1967a, 1967b) SINGH und SHARMA (1983)
	Lb. salivarius	MILLER und KANDLER (1967b)
	Lb. casei	BRANDSAETER und NELSON (1956) MILLER und KANDLER (1967a, 1967c)
	Lb. plantarum	MILLER und KANDLER (1967a, 1967c)
	Lb. coryniformis	MILLER und KANDLER (1967a, 1967c)

Anmerkung: ¹⁾ Nun als Variante von Lactobacillus helveticus klassifiziert, siehe KANDLER und WEISS (1986).

2.3.3 Proteolyten als Krankheitserreger

Unter den in Tabelle 1 (Seite 3) aufgeführten proteolytisch aktiven Bakterien befinden sich zahlreiche Gattungen, denen als obligat oder fakultativ pathogen geltende Species angehören. Auf die im klinischen Bereich als Hospitalismus-Keime und Erreger verschiedener Infektionskrankheiten bekannten Vertreter soll hier nicht weiter eingegangen werden. Zu den als obligate "Lebensmittelvergifter" geltenden Species gehören unter anderem enteropathogene Escherichia coli (KORNACKI und MARTH, 1982), Staphylococcus aureus (EASMON und ADLAM, 1983), Bacillus cereus (JOHNSON, 1984), Clostridium perfringens (HOBBS, 1979) und Clostridium botulinum (SAKAGUCHI, 1979). Zu den fakultativen Erregern (sogenannten Opportunisten) von Gastroenteritiden gehören vor allem einige Enterobacteriaceae wie Citrobacter (BRYAN, 1979), Klebsiella (HORVATH et al., 1964; ORMAY und NOVOTNY, 1970; KLIPSTEIN et al., 1977) und Enterobacter

(KLIPSTEIN et al., 1977), weiterhin *Pseudomonas aeruginosa* (HUNTER und ENSIGN, 1947; FLORMAN und SCHIFRIN, 1950; ORMAY und NOVOTNY, 1970), *Aeromonas hydrophila* und andere *Aeromonas* spp. (JANDA et al., 1983) und *Bacillus* spp. wie *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* (GILBERT et al., 1981).

Proteus spp. (MUMME, 1955; SEIDEL, 1964; ORMAY und NOVOTNY, 1970) und Enterokokken (ADAM, 1958; ORMAY und NOVOTNY, 1970) wurden ebenfalls für Ausbrüche von "Lebensmittelvergiftungen" verantwortlich gemacht, doch bleibt ihre Rolle dabei umstritten (BRYAN, 1979).

Nach SCHÖNBERG und KÖNEKAMP (1962) sind "unspezifische Lebensmittelvergiftungen" oder "Fäulnisintoxikationen" solche Lebensmittelvergiftungen, die durch "an und für sich nicht krankmachende Bakterien" verursacht werden, im Gegensatz zu den spezifischen, durch Salmonellen, Staphylokokken-Enterotoxine oder *Clostridium botulinum*-Toxine ausgelösten "Lebensmittelvergiftungen". Als Erreger kommen nach SCHÖNBERG (1949) vor allem "besondere Bakterien aus der *Proteus*-, der *Coli*-, der Mikrokokken- und der *Mesentericus-subtilis*-Gruppe und auch obligate Anaerobier, z.B. der *Fraenkelsche Gasbazillus*" in Frage. Die pathogene Bedeutung dieser Keime soll in ihrer proteolytischen Aktivität in Verbindung mit dem Abbau der freigesetzten Aminosäuren zu biogenen Aminen und anderen, teils toxischen Verbindungen bestehen (SCHÖNBERG, 1949; ROEMMELE, 1957; SCHÖNBERG und KÖNEKAMP, 1962), wobei die Wirkung spezifischer Bakterientoxine noch dazukommen kann (SCHÖNBERG, 1949). Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen "Ptomainen" oder "Leichengiften", womit allgemein bei der Leichenfäulnis entstehende, z.T. toxisch wirkende Stickstoffbasen gemeint sind (ANONYM, 1973), und Nahrungsmittelvergiftungen wurde schon frühzeitig abgelehnt (SEIDEL, 1964), was auch SCHÖNBERG (1949) und SCHÖNBERG und KÖNEKAMP (1962) einräumen.

Biogene Amine können zwar durch die Decarboxylaseaktivität zahlreicher Bakterien gegenüber den entsprechenden Aminosäuren entstehen (siehe Tabelle 7), wobei auffällt, daß bis auf die beiden *Salmonellenspecies* alle in der Tabelle 7 aufgeführten, bestimmte Aminosäuren decarboxylierenden Bakterien Gattungen angehören, von denen proteolytische Species bzw. Stämme beschrieben worden sind (vergleiche Tabelle 1, Seite 3). Es wurden aber in Milch auch unter ungünstigen hygienischen Bedingungen keine für gesunde Menschen gefährlich erscheinenden Mengen an Tyramin, Histamin oder anderen biogenen Aminen gefunden

Tabelle 7: Aminosäuren decarboxylierende Bakterien

Familie	Gattung bzw. Species	Decarboxylaseaktivität gegenüber	Autor(en)
Pseudo- monadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Histidin	TERPLAN et al. (1973)
Entero- bacteriaceae	<i>Escherichia coli</i> und andere Coliforme	(meiste Stämme:) Lysin, Glutaminsäure, Arginin, Ornithin (wenige Stämme:) Tyrosin, Histidin	GALE (1946)
	<i>Escherichia coli</i>	Histidin	TERPLAN et al. (1973)
	<i>Citrobacter</i> sp.	Histidin	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Histidin	
	<i>Salmonella dublin</i>	Histidin	
	<i>Salmonella typhi</i>	Histidin	
	<i>Serratia marcescens</i>	Histidin	
	<i>Proteus</i> spp.	Glutaminsäure, Ornithin	GALE (1946)
	<i>Proteus vulgaris</i>	Histidin	TERPLAN et al. (1973)
Micro- coccaceae	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Histidin	TERPLAN et al. (1973)
(Weitere grampositive Kokken)	Streptokokken der Lancefield-Gruppen A, B, C, E, F	Tyrosin	GALE (1946)
	<i>Streptococcus faecalis</i> und andere D-Streptokokken ¹	Tyrosin	GALE (1946)
	<i>Streptococcus faecalis</i> ¹	Tyrosin, Arginin	LAGERBORG und CLAPPER (1952)
	<i>Streptococcus faecalis</i> ¹	Tyrosin, Histidin	TERPLAN et al. (1973)
	<i>Streptococcus faecium</i> ¹	Histidin	
	<i>Streptococcus durans</i> ²	Histidin	
	<i>Streptococcus mitis</i>	Tyrosin, Arginin	LAGERBORG und CLAPPER (1952)
(Gram- positive Stäbchen)	<i>Bacillus subtilis</i>	Arginin, Lysin, Ornithin, Glutaminsäure	GALE (1946)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Histidin	TERPLAN et al. (1973)
	<i>Bacillus mesentericus</i> ³	Arginin, Lysin, Ornithin, Glutaminsäure	GALE (1946)
	<i>Bacillus cereus</i>	Tyrosin, Histidin	TERPLAN et al. (1973)
	<i>Clostridium welchii</i> ⁴	Histidin, Glutaminsäure	GALE (1946)
	<i>Clostridium septicum</i>	Ornithin	
	<i>Clostridium bifermentans</i>	Glutaminsäure	
	<i>Clostridium fallax</i>	Histidin	

¹) Vgl. Anmerkung 4 zu Tabelle 1. ²) Nun *Enterococcus durans*, siehe COLLINS et al. (1984).

³) Nun als *Bacillus subtilis* klassifiziert, siehe GIBSON und GORDON (1974).

⁴) Nun *Clostridium perfringens*, siehe BREED et al. (1957).

(LÜCK et al., 1964; TERPLAN et al., 1973). Auch durch die in Trockenmilchprodukten gemessenen Tyramin- und Histaminkonzentrationen ist eine Gefährdung der Konsumenten unwahrscheinlich (GROVE und TERPLAN, 1975). Hohe Konzentrationen an biogenen Aminen, vor allem Tyramin, Histamin und Tryptamin (VOIGT et al., 1974) werden aber oft in Käse nachgewiesen, und man geht allgemein davon aus, daß diese durch die Tätigkeit von Bakterien entstehen, welche beim Eiweißabbau während der Käsereifung anfallende Aminosäuren decarboxylieren (BINDER und BRANDL, 1984). Schädliche Wirkungen durch die in Käse vorkommenden Tyraminkonzentrationen sind bei gesunden Menschen offensichtlich noch nicht beschrieben worden. Jedoch können diese Tyraminmengen bei empfänglichen Personen zu Migräneanfällen führen (HANINGTON, 1967) und bei Patienten, die mit Monoaminoxidase-Inhibitoren behandelt werden, Kopfschmerzen (BLACKWELL, 1963; FOSTER, 1963) und Bluthochdruckkrisen (BLACKWELL, 1963; BLACKWELL und MABBITT, 1965) erzeugen. Eine von BLACKWELL und MABBITT (1965) für mit Monoaminoxidase-Inhibitoren behandelte Patienten bereits als gefährlich angesehene orale Tyramindosis von 25 mg wird von einem großen Teil der von DAHLBERG und KOSIKOWSKI (1948), SEN (1969) und COLONNA und ADDA (1976) und einigen der von BLACKWELL und MABBITT (1965), VOIGT et al. (1974), DE VUYST et al. (1976) und BINDER und BRANDL (1984) untersuchten Käsen schon bei einem Verzehr von 50 g erreicht. Über auf den Genuß von Käse zurückgeführte Histaminvergiftungen wurden in der Literatur nur wenige Veröffentlichungen gefunden (z.B. DOEGLAS et al., 1967).

Neuere Erkenntnisse sprechen dafür, daß vielen der früher als "unspezifisch" bezeichneten "Lebensmittelvergiftungen" in der Regel spezifische pathogene Prinzipien ganz bestimmter Keime zugrunde liegen. So können Enteritiden hervorrufoende Escherichia coli-Stämme zur Invasion der Darmschleimhaut mit anschließender Vermehrung, zur Besiedelung und Zerstörung der Mikrovilli ohne Invasion oder zur Produktion von Enterotoxinen befähigt sein (GENIGEORGIS, 1981; KORNACKI und MARTH, 1982). Bekannt ist auch das Enterotoxinbildungsvermögen bestimmter Stämme von Clostridium perfringens (HOBBS, 1979). Von den beiden durch Bacillus cereus verursachten Vergiftungssyndromen beim Menschen wird die eine Form, die durch Durchfall gekennzeichnet ist und nach einer langen Inkubationszeit von 8-16 h einsetzt (GILBERT et al., 1981), vermutlich durch ein hitzelabiles Enterotoxin mit Proteincharakter ausgelöst (GOEPFERT et al., 1973). Das wirksame Agens bei der zweiten, durch Erbrechen nach einer

kurzen Inkubationszeit von 1–5 h charakterisierten Form (GILBERT et al., 1981) scheint eine hitzestabile niedermolekulare Verbindung zu sein (MELLING und CAPEL, 1978). Auch bei einigen der oben als fakultativ pathogen aufgeführten Keimen wurde schon Enterotoxinbildungsvermögen nachgewiesen, so bei *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* (KLIPSTEIN et al., 1977), *Pseudomonas aeruginosa* (KUBOTA und LIU, 1971), *Aeromonas hydrophila* und anderen *Aeromonas* spp. (BURKE et al., 1983; WATSON et al., 1985).

Zur Auslösung einer "Lebensmittelvergiftung" scheinen von den meisten pathogenen Proteolyten in der Regel Keimzahlen von mindestens 10^6 /g notwendig zu sein. So kann nach MOSSEL (1956) eine größere Anzahl – im allgemeinen mehr als 10^6 /g – "saprophytischer" Bakterien in Lebensmitteln stets eine bakterielle Lebensmittelvergiftung auslösen. Nach ORMAY und NOVOTNY (1970) sind bei Lebensmittelvergiftungen die fakultativ pathogenen Bakterien (wozu diese Autoren auch *Bacillus cereus* und *Clostridium perfringens* zählen) meistens in einer großen Keimzahl von 10^6 /g oder mehr vorhanden. Einer Literaturzusammenstellung bei BECKER et al. (1984) zufolge sind auch für eine *Bacillus cereus*-Intoxikation in der Regel Keimgehalte von 10^6 – 10^8 /g Lebensmittel notwendig. Es wird aber auch von Ausbrüchen berichtet, bei denen z.T. wesentlich geringere *Bacillus cereus*-Zahlen – die niedrigste betrug $1,2 \times 10^3$ /g – bereits zu einer Intoxikation führten. Betroffen waren in den letzteren Fällen oft Kinder, Kranke und alte Menschen.

2.4 Spezielle Bedeutung von Verderb verursachenden Proteolyten in Milch und Milchprodukten

2.4.1 Rohmilch

2.4.1.1 Proteolytenspecies in Rohmilch

Bedingt durch den maschinellen Milchentzug (BLAU und KIELWEIN, 1985) und die Kühlung der Rohmilch während Lagerung und Transport besteht die Mikroflora der Milch zum Zeitpunkt der Be- und Verarbeitung oft zu einem großen Teil aus gramnegativen Psychrotrophen (MABBITT, 1981), wobei die Gattung *Pseudomonas* überwiegt (WHITE et al., 1978; GEBRE-EGZIABHER et al., 1980a; KROLL et al., 1984; O'CONNOR et al., 1986) und innerhalb dieser die Species *Pseudomonas fluorescens* dominiert (KROLL et al., 1984; O'CONNOR et al., 1986). Von den von LAW et al. (1979) aus Rohmilch isolierten psychrotrophen Proteo-

lyten waren *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas fragi* zusammen mit *Acinetobacter* spp. und *Aeromonas* spp. am verbreitetsten. Darüber hinaus wurden alle weiteren, in Tabelle 3 (Seite 22) aufgeführten psychrotrophen gramnegativen Stäbchen, nichtsporenbildenden grampositiven Bakterien sowie aeroben und anaeroben Sporenbildner ebenso wie die in Tabelle 4 (Seite 23) aufgelisteten aeroben Sporenbildner - außer den von OVERCAST und ATMARAM (1974) sowie WASHAM et al. (1977) beschriebenen Bazillen - aus Rohmilch isoliert.

2.4.1.2 Herkunft der Proteolyten in Rohmilch

2.4.1.2.1 Sekretorischer Keimgehalt

Die bei gesunden Tieren im oberen Teil der Milchdrüse normalerweise noch sterile Milch (HEIDRICH et al., 1964a, 1964b) wird beim Passieren des Strichkanals durch dessen Mikroflora in einer Größenordnung von 10^2 Keimen/ml kontaminiert (KLETER und DE VRIES, 1974). In "aseptisch" ermolkenen Rohmilch fand KLETER (1974) *Micrococcus* spp., *Staphylococcus aureus* und andere Staphylokokken sowie *Corynebacterium bovis*. Zu allen drei genannten Gattungen gehören proteolytische Species bzw. Stämme (vergleiche Tabelle 1, Seite 3). Zu *Staphylococcus aureus* ist anzumerken, daß die meisten Stämme dieser Species proteolytisch aktiv sind (BAIRD-PARKER, 1965; HASCHE et al., 1977).

2.4.1.2.2 Postsekretorischer Keimgehalt

Der postsekretorische Keimgehalt umfaßt vom Tierkörper, vom Melkpersonal, aus dem Stallmilieu und von den Oberflächen der Milchgerätschaften stammende Mikroorganismen.

OTTE et al. (1978) untersuchten das Vorkommen von *Pseudomonas aeruginosa* im "Biotop Stall-Milchtier-Milch-Mensch" in fünf Problembetrieben. Dabei betrug der Anteil der positiven Befunde bei Einzelgemelksproben 5,4 %, bei Viertelgemelksproben 4,0 %, bei Proben von der Zitzenoberfläche 1,0 % und von der Euteroberfläche 0,7 %. *Pseudomonas aeruginosa* konnte in wenigen Fällen auch auf den Handflächen des Melkpersonals nachgewiesen werden.

Auf die Bedeutung der Staubentwicklung im Stall durch Futter und Einstreu, besonders kurz vor und während des Melkens, weisen SCHÖNBERG und KRAUS

(1956a, 1956b) hin. Nach SCHÖNBERG und KRAUS (1956b) beeinflußt im Milchviehstall in erster Linie das Streumaterial den Keimgehalt der Luft. Dieses enthält meistens in großer Zahl Caseolyten, vor allem in Form von Bazillensporen. Der Luftkeimgehalt wird auch erhöht, wenn kurz vor oder während des Melkens der Dung entfernt wird. Sporen von Anaerobiern sind in Silage besonders reichlich vorhanden. Bei Silagefütterung steigt der Gehalt des Kots an Clostridien-sporen, die somit durch fäkale Verunreinigung in die Milch gelangen können (EMALDI et al., 1977).

Die Mikroflora der Milchgerätschaften - hauptsächlich gramnegative Stäbchen - ist die wichtigste Kontaminationsquelle der Rohmilch mit Bakterien (KURZWEIL und BUSSE; 1973; BLAU und KIELWEIN, 1985). So stellte KIELWEIN (1968) fest, daß die häufige Belastung der Rohmilch mit Pseudomonaden ihre Ursache in erster Linie in stark belasteten Melkgeräten hat. Vor allem in schlecht gereinigten Melkmaschinen, aber auch in "Desinfektionslösungen" gelang der Nachweis von Pseudomonaden in erheblichem Umfang. Diese erwiesen sich in der Praxis als außerordentlich widerstandsfähig gegenüber den gebräuchlichen Desinfektionsmitteln. Ebenso wie die Pseudomonaden können auch Aeromonaden aus schmierigen Belägen schlecht gereinigter Melkgeräte isoliert werden (KIELWEIN et al., 1969); die Kontamination der Melkgeräte mit Aeromonaden dürfte ihren Ausgangspunkt im Brauchwasser und im Stallschmutz haben. Zur gramnegativen "Melkmaschinenflora" gehören auch Enterobacteriaceae (KURZWEIL und BUSSE, 1973). Psychrotrophe Sporenbildner können ebenfalls von den Oberflächen der Milchgerätschaften stammen. Nach CANNON (1972) sank der Gehalt der Tanksammelmilch eines Milcherzeugers an psychrotrophen Sporen beträchtlich, nachdem alte Dichtungsringe der Leitungen ausgewechselt worden waren.

2.4.1.3 Bedeutung der Proteolyten in Rohmilch

Die gramnegativen Psychrotrophen, insbesondere die Pseudomonaden (LAW et al., 1979), haben eine ausgeprägte Fähigkeit zum Abbau von Fett und Protein. Ihre Vermehrung in Rohmilch ist in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung (MABBITT, 1981):

- a) Veränderungen in der Zusammensetzung der Milch können deren Verarbeitungsfähigkeit beeinträchtigen, vor allem, wenn in den Verarbeitungsprozeß eine Fermentation einbezogen ist.

- b) Sensorische Eigenschaften der Rohmilch können beeinträchtigt werden (siehe Abschnitt 2.3.1.3.1, Seite 16), was sich auch auf die pasteurisierte Milch oder die Milchprodukte auswirken kann.
- c) Thermostabile bakterielle Enzyme können in hitzebehandelter Milch und in Milchprodukten vor allem während längerer Lagerperioden weiterwirken.

Bevor in Rohmilch Proteolyse nachweisbar wird, müssen die psychrotrophen Bakterien allerdings in Keimzahlen von über 10^6 /ml vorhanden sein (LAW, 1979; MUIR und PHILLIPS, 1984).

2.4.2 Pasteurisierte Milch

Wie bereits im Abschnitt 2.3.1.3.5 (Seite 24) erwähnt, wird die Haltbarkeit von pasteurisierter Milch weniger von der Aktivität der die Hitzebehandlung überlebenden Flora bestimmt, als vom Grad der Rekontamination (TOLLE, 1979) und der Aktivität der hitzestabilen Enzyme der bei der Pasteurisierung größtenteils abgetöteten gramnegativen Psychrotrophen der Rohmilch (LAW, 1979). Bei den Rekontaminanten handelt es sich hauptsächlich um psychrotrophe gramnegative Stäbchen, vor allem Pseudomonaden (TOLLE, 1979), die von den Oberflächen der Molkereianlagen und aus dem Brauchwasser der Molkerei stammen (COLLINS, 1981). Auch ursprünglich nur wenige psychrotrophe gramnegative Rekontaminanten vermehren sich unter den Bedingungen der Kühlagerung schnell und führen zu Minderung von Qualität und Haltbarkeit (TOLLE, 1979). Durch eine Reduzierung der Rekontamination steigt die Haltbarkeit von pasteurisierter Milch. Dadurch erlangen psychrotrophe Sporenbildner, vor allem *Bacillus* spp., zunehmend an Bedeutung. Diese und andere thermodure Keime können bitteren, fruchtigen, ranzigen oder hefigen Geschmack verursachen und die Milch süßgerinnen lassen. Erstes Anzeichen des Verderbs ist gewöhnlich die Ausbildung eines Süßgerinnsels am Boden des Milchkartons (COLLINS, 1981).

2.4.3 Ultrahocherhitzte Milch

Bei der Ultrahocherhitzung wird die Milch entsprechend der Ersten Verordnung zur Ausführung des Milchgesetzes vom 15. Mai 1931 kurzfristig auf Temperaturen von 135–150 °C erhitzt und unter sterilen Bedingungen abgefüllt. Damit werden die ursprünglich enthaltenen Keime weitgehend abgetötet (BURTON, 1969)

bzw. wird eine Rekontamination verhindert. UHT-Milch gilt allerdings nicht als steril, sondern als "kommerziell steril" (BURTON, 1969), da eventuell vermehrungsfähige Sporen, vor allem von *Bacillus stearothermophilus*, erhalten bleiben, die jedoch aufgrund eines Hemmeffektes der ultrahocherhitzten Milch selbst bei ihrer optimalen Wachstumstemperatur in der Regel nicht auskeimen (BURTON et al., 1959).

Es herrscht heute weitgehend Übereinstimmung darin, daß eine Süßgerinnung von ultrahocherhitzter Milch ebenso wie die gelegentlich auftretende Ausbildung eines bitteren Geschmacks auf die Tätigkeit von hitzeresistenten bakteriellen Proteinasen zurückzuführen ist (CHRISTOPHERSEN, 1980), die durch die UHT-Behandlung nur einen unwesentlichen Aktivitätsverlust erfahren (ADAMS et al., 1975; LAW et al., 1977). Dies unterstreicht, daß zur Herstellung von H-Milch nur Rohmilch bester Qualität herangezogen werden sollte. In diesem Sinne ist in der Ersten Verordnung zur Ausführung des Milchgesetzes die Verwendung von Anlieferungsmilch der Güteklasse I vorgeschrieben.

2.4.4 Milchtrockenprodukte

Die Verordnung über Milcherzeugnisse vom 15. Juli 1970 schreibt vor, daß alle Milcherzeugnisse - wozu auch Milchtrockenprodukte zählen - einem der in der Ersten Verordnung zur Ausführung des Milchgesetzes vom 15. Mai 1931 zugelassenen Erhitzungsverfahren zu unterziehen sind bzw. aus Milch oder Milcherzeugnissen hergestellt werden, die nach diesen Vorschriften behandelt worden sind. Zur Trocknung bestimmte Milch wird pasteurisiert, durch Eindampfen im Vakuum konzentriert und schließlich walzen- oder sprühgetrocknet (MENNINGER, 1957).

Die Flora eines Milchpulvers setzt sich aus denjenigen Überlebenden der Pasteurisierung (thermodure Bakterien siehe Tabelle 5, Seite 25) und denjenigen Rekontaminanten nach der Pasteurisierung, die die Trocknung überlebt haben, sowie den Rekontaminanten nach der Trocknung zusammen (STADHOUDERS et al., 1982). Dabei ist die Mikroflora von walzengetrocknetem Milchpulver wegen der stärkeren Hitzeeinwirkung artenärmer als die von sprühgetrocknetem Milchpulver (MENNINGER, 1957). Das Keimpektrum von sprühgetrocknetem Milchpulver umfaßt neben der thermoduren Flora nicht-thermodure Mikroorganismen wie *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* und andere gramnegative Stäbchen. Die nicht-thermoduren Bakterien gelangen gewöhnlich als Rekon-

taminanten nach der Trocknung in das Produkt, können aber auch in geringem Maße die Trocknung überlebt haben (STADHOUDERS et al., 1982). In ordnungsgemäß produziertem und gelagertem Milchpulver ist aufgrund der sehr geringen Wasseraktivität mikrobielles Wachstum nicht möglich (MOSSEL, 1975). Die Zahl der Mikroorganismen nimmt vielmehr während der Lagerung allmählich ab. In alten Milchpulvern können Sporenbildner die vorherrschende Flora darstellen (MENNINGER, 1957). *Bacillus* spp. scheinen auch den Hauptteil der Caseolyten in Milchtrockenprodukten für Säuglinge und Kleinkinder auszumachen (MEYER, 1975; FORSCHNER, 1976).

Anzumerken ist, daß in der Bundesrepublik Deutschland keine Rechtsvorschriften bezüglich der Qualität der zur Herstellung von Milchpulver verwendeten Rohmilch existieren. Zu der in dieser Hinsicht interessanten Frage einer möglichen Aktivität von hitzeresistenten bakteriellen Proteinasen im Milchpulver konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden.

Wie oben bereits erwähnt, ist im Milchpulver bakterielles Wachstum in der Regel nicht möglich. Nach Auflösen des Trockenprodukts jedoch können sich die in ihm enthaltenen Keime wieder vermehren. Während Bazillen in gewöhnlicher Trinkmilch im allgemeinen von untergeordneter Bedeutung sind, weil - je nach den Bedingungen - Milchsäurebakterien (MENNINGER, 1957) oder gramnegative Stäbchen (COLLINS, 1981) ihr Wachstum hemmen, können sie sich in aus Pulver rekonstituierter Milch ohne die Konkurrenz einer antagonistischen Flora stark vermehren, durch ihre proteolytische und lipolytische Aktivität Geschmacksfehler verursachen, zur Süßgerinnung führen und "toxische Stoffwechselprodukte" produzieren, die vor allem für Kleinkinder stark gesundheitsschädigend sein sollen. Gastroenteritiden, z.T. in Form von Brechdurchfällen, können die Folge des Genusses derart verdorbener Milch sein (MENNINGER, 1957). Diese mögliche pathogene Bedeutung von Bazillen und anderen Proteolyten (siehe hierzu Abschnitt 2.3.3, Seite 27) in Milchtrockenprodukten für Säuglinge und Kleinkinder führte zu Bestrebungen, Grenzwerte für den Proteolytengehalt solcher Lebensmittel festzusetzen. So verlangten ROEMMELE (1957) und ROEMMELE und WESTPHAL (1957), für Milchtrockenprodukte zur Säuglingsernährung, welche bis zu diesem Zeitpunkt in der Bundesrepublik Deutschland einer bakteriologisch-hygienischen Überwachung nicht unterlagen, den Bestimmungen für Vorzugsmilch entsprechende, besonders hoch bemessene Anforderungen an Gewinnung, Beschaffenheit, Behandlung, Aufbewahrung und Verpackung zu stellen, und machten

Vorschläge für die Prüfung und Beurteilung solcher Produkte in den Veterinäruntersuchungsämtern. Ein Grenzwert allgemein für Caseolyten wurde nicht vorgeschlagen, jedoch sollte die Zahl der aeroben Sporenbildner 50 Keime/ml einer vorschriftsmäßig gelösten Milch nicht überschreiten (ROEMMELE und WESTPHAL, 1957). BULLING (1959) schlug zur Beurteilung von Säuglingstrockenmilchpräparaten für aerobe Sporenbildner einen Höchstgehalt von 50/ml rekonstituiertes Präparat, für "sonstige Kaseolyten" von 100/ml vor. Der Gesamtgrenzwert von 150 Caseolyten/ml aufgelöstes Präparat wurde schließlich in der Verordnung über diätetische Lebensmittel vom 20. Juni 1963 in § 14 verbindlich festgelegt, wonach diätetische Lebensmittel für Säuglinge oder Kleinkinder, sofern sie unter Verwendung von Milch, Milcherzeugnissen oder Milchbestandteilen hergestellt sind, unter anderem die Anforderung erfüllen müssen, daß "in 1,0 Milliliter des genußfertig oder in 0,1 Gramm des trocken oder eingedickt in den Verkehr gebrachten Lebensmittels nicht mehr als 150 aerobe sporenbildende oder andere eiweißlösende Bakterien (Kaseolyten) züchtbar sein" dürfen.

Die Caseolytengehalte verschiedener Milchtrockenprodukte gibt Tabelle 8 wieder.

Tabelle 8: Caseolytengehalte von Milchtrockenprodukten

Probenmaterial	Zahl der Proben	Caseolyten pro 0,1 g Pulver	Nährboden	Autor(en)
Sprühmagermilchpulver	6	bis 70	Caseinagar nach FRAZIER und RUPP (1928) in der Modifikation von BRANDT (1939)	CIBLIS und SCHWARZ (1962)
Walzenmagermilchpulver	4	5 - 145		
Milchtrockenprodukte für Säuglinge	122	nur 2 Proben über 150 (400 bzw. 2 220)	Calcium-Casein-peptonagar nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958)	BONTEMPS und SIMON (1965)
Sprühvollmilchpulver	22	0 - 400	Milchagar nach BAIRD-PARKER (1963)	KRAMPE (1972)
Walzenvollmilchpulver	8	1 - 150		
Sprühmagermilchpulver	38	2 - 2 600 000		
Walzenmagermilchpulver	12	7 - 620		
Milchtrockenprodukte für Säuglinge	60	0 - 4 150		
Futtermilchpulver	19	3 - 4 600	Calcium-Casein-peptonagar nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958)	MEYER (1975)
Säuglingsnahrung auf Trockenquarkbasis mit Fruchtzusätzen (Banane oder Apfel)	keine Angaben	"des öfteren" ca. 300 - 400		

2.4.5 Käse

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß ein gewisser Eiweißabbau in Käse prinzipiell erwünscht ist (siehe Abschnitt 2.3.2, Seite 25). Allerdings können durch die proteolytische Aktivität mancher Starterkulturen ebenso wie durch das Labenzym bittere Peptide freigesetzt werden und damit einen der häufigsten Geschmacksfehler bei Käse erzeugen (VISSER, 1977). Bittergeschmack ist bei Gouda und Cheddar-Käse seit langem bekannt (VISSER, 1977), wurde aber auch schon bei Emmentaler (MAIR-WALDBURG und STURM, 1958; PELISSIER et al., 1974), Alpkäse (GUIGOZ und SOLMS, 1974), Weichkäsen wie Camembert oder Saint-Paulin, halbfesten Schnittkäsen wie Bleu d'Auvergne oder Roquefort (PELISSIER et al., 1974) und Cottage cheese (STONE und NAFF, 1967) beschrieben.

Einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Bittergeschmack in Käse und dem Einsatz bestimmter Starterkulturen zeigten bereits EMMONS et al. (1962) auf. Diese Autoren setzten elf *Streptococcus cremoris*-Stämme einzeln zur Herstellung von Cheddar-Käse ein. Mit sieben dieser Stämme erhielt man Käse, der nach sechsmonatiger Reifung bitter war. GORDON und SPECK (1965) sprechen in diesem Zusammenhang von "bitteren" und "nicht bitteren" Stämmen. SULLIVAN et al. (1973) zeigten, daß "bittere" *Streptococcus cremoris*-Stämme im Gegensatz zu "nicht bitteren" Stämmen bei pH 5,0, dem pH-Wert von reifendem Käse, nicht in der Lage waren, bittere Peptide aus tryptisch verdaulichem Casein zu hydrolysieren, während bei pH 7,0 sowohl bei "bitteren" als auch bei "nicht bitteren" Stämmen die Peptidaseaktivität zum Abbau der Peptide ausreichte. VISSER (1977) wies nach, daß sowohl Labenzym als auch "bittere" *Streptococcus cremoris*-Stämme jeweils alleine in der Lage sind, in Gouda-Käse Bittergeschmack zu erzeugen. "Nicht bittere" Starter vermögen unter den im Gouda herrschenden Bedingungen beträchtliche Mengen von bitteren Peptiden in nicht bittere Abbauprodukte umzusetzen und damit auch die vom Labenzym freigesetzten bitteren Spaltprodukte zu "entbittern", wogegen "bittere" Starter diese Fähigkeit in viel geringerem Umfang aufzuweisen scheinen. Allerdings zeigten LOWRIE et al. (1972), daß zumindest bei Cheddar-Käse auch "nicht bittere" Streptokokkenstämme in der Lage sind, bitteren Käse zu erzeugen, wenn sie infolge einer Senkung der Brenntemperatur ähnlich hohe Keimzahlen erreichen wie "bittere" Stämme. Mit "nicht bitteren" Kulturen in üblicher Weise hergestellter Cheddar-Käse ist demnach hauptsächlich deshalb nicht bitter, weil die Vermehrung der "nicht bitteren" Stämme - im Gegensatz zu

den "bitteren" - durch die bei der Cheddar-Herstellung gebräuchlichen Brenntemperaturen gehemmt wird. Jedoch hatte der bittere Geschmack von Käse, der mit "nicht bitteren" Stämmen bei tieferen Brenntemperaturen hergestellt worden war, nach sechsmonatiger Reifung beträchtlich abgenommen, im Gegensatz zu mit "bitteren" Stämmen produziertem Käse, was auch hier für einen intensiveren Abbau von bitteren Peptiden durch "nicht bittere" Stämme spricht.

Neben Stämmen von N-Streptokokken können auch die bei verschiedenen Käsearten gelegentlich herkömmlichen Starterkulturen zugesetzten Enterokokken Bittergeschmack hervorrufen (HAHN, 1984). Aber auch Keime der Rohmilchflora wurden schon als Ursache von bitterem Geschmack in Käse vermutet: MAIR-WALDBURG und STURM (1958) isolierten "acido-proteolytische Keime vom Typ *Str. liquefaciens* Sternberg" als Erreger von Bittergeschmack aus Emmentalerkäse. STONE und NAFF (1967) wiederum fanden Hinweise, daß Bittergeschmack in Cottage cheese allgemein auf die Aktivität psychrophiler Bakterien zurückzuführen ist.

Erwähnt werden soll noch, daß in der Käserei auch Fäulnis erregende Clostridien Schäden verursachen können. So gilt *Clostridium sporogenes* ("*Bacillus putrificus*") als Erreger der sogenannten Weißfäule ("*Stinker*"-Käse, "*Putrificus*"-Käse) bei Emmentalerkäse (SCHULZ und VOSS, 1965; HEILMEIER, 1985).

2.4.6 Butter

Gemäß der Butter-Verordnung vom 2. Juni 1951 darf Butter nicht weniger als 82 % Fett und nicht mehr als 16 % Wasser enthalten. Neben Fett und Wasser enthält sie unter anderem noch etwa 0,5 - 0,6 % Eiweiß, das zum größten Teil aus Casein besteht (NESENI, 1948). Für die Vermehrung von Mikroorganismen in Butter ist die Größe und Verteilung der Wassertröpfchen entscheidend. Bei Durchmessern von 4 μ und weniger ist die Mehrzahl der Tröpfchen keimfrei, und in den kontaminierten Tröpfchen ist, bedingt durch den Mangel an verfügbarem Wasser und an Nährstoffen, Wachstum so gut wie ausgeschlossen (DEMETER, 1956d). Wenn jedoch die Butter beim Herstellungsprozeß bakteriell kontaminiert wird und eine ungünstige Wasserverteilung, eventuell zusammen mit einer hohen Lagertemperatur, mikrobielles Wachstum begünstigt, kann es zum Verderb kommen (MARSHALL et al., 1985).

Auf bakteriellen Proteinabbau (DEMETER, 1956b) werden einige ähnliche But-

terfehler zurückgeführt, die im deutschsprachigen Schrifttum als "fauliger" oder "käsiger" Geschmack (DEMETER, 1956b), in der englischsprachigen Literatur als "surface taint", "decomposed odor", "rabbito", "foetid", "putrid" (WAGENAAR, 1952) oder auch "putrefactive" (LIGHTBODY, 1961) charakterisiert werden. Der Ausdruck "surface taint" soll besagen, daß sich der Fehler anfangs an der Oberfläche der Butter manifestiert, ist aber nicht glücklich gewählt, da sehr schnell die gesamte Buttermasse erfaßt wird (WAGENAAR, 1952). Die australische Bezeichnung "rabbito" weist darauf hin, daß die betreffende Butter einen Geruch nach fauligem Kaninchenfleisch besitzt (DEMETER, 1956b). Schon die erste Veröffentlichung über eine bakteriologische Untersuchung von Butter befaßte sich mit einer Probe, die "äußerst unangenehm nach faulendem Harn" roch (KRUEGER, 1890). Während sich seither im älteren Schrifttum zahlreiche Berichte über derartige Geschmacksfehler in Butter finden (siehe dazu die Literatur bei WAGENAAR, 1952, und DEMETER, 1956b), liegen aus neuerer Zeit nur noch sehr wenige Veröffentlichungen zu diesem Thema vor (z.B. OLIVEIRA, 1969/1970; JOOSTE et al., 1986). Was die Häufigkeit der Mängel "faulig" und "käsig" betrifft, so lag bei in Deutschland angestellten Erhebungen über das Auftreten verschiedener Butterfehler der Mangel "käsig" an achter (KELLER, 1948) bzw. sechster Stelle (SAITNER, 1949), der Fehler "faulig" an elfter Stelle (KELLER, 1948).

Als Haupterreger der angeführten Fehlergruppe gilt *Pseudomonas putrefaciens*, der erstmals von DERBY und HAMMER (1931) aus "surface taint"-Butter isoliert und als "*Achromobacter putrefaciens*" beschrieben worden war (WAGENAAR, 1952). Neuerdings wird dieser Keim als *Alteromonas putrefaciens* klassifiziert (BAUMANN et al., 1984). Aber auch Flavobakterien können solche Butterfehler hervorrufen (JOOSTE et al., 1986). In den Fällen, in denen Butter als "typisch käsig" bezeichnet wird, dürfte *Pseudomonas putrefaciens* innerhalb einer Mischflora verschiedener, meist proteolytischer Keime nur eine untergeordnete Rolle spielen (DEMETER, 1956b). Darüber, ob in diesem Zusammenhang auch hitzeresistente Proteinase der Rohmilchflora von Bedeutung sind, konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden.

"Surface taint" scheint ausschließlich in Butter aufzutreten, die aus pasteurisiertem Rahm hergestellt ist (WAGENAAR, 1952), und zwar in der Regel nur dann, wenn bereits der Rahm nach der Pasteurisierung mit *Pseudomonas putrefaciens* kontaminiert wird (DERBY und HAMMER, 1931). Auch Flavobakterien

können den Fehler "faulig" in gesalzener Butter offenbar nur hervorrufen, wenn sie im pasteurisierten Rahm vor dem Buttern wachsen (JOOSTE et al., 1986). Zwar verhindert die Rahmsäuerung das Auftreten von "surface taint" weitgehend (DERBY und HAMMER, 1931; CLAYDON und HAMMER, 1939), doch wurde der Fehler auch schon in aus gereiftem Rahm hergestellter Butter beobachtet (CLAYDON und HAMMER, 1939). Die Rekontamination des Rahms mit *Pseudomonas putrefaciens* erfolgt in der Regel über kontaminierte Molke-reigerätschaften, vor allem den Butterfertiger, wobei Holzteile von besonderer Bedeutung sind. Ursprünglich stammt der Erreger wohl aus dem Molkereiwasser (WAGENAAR, 1952).

Zwar sind die Erreger des "surface taint" Proteolyten (DEMETER, 1956b,c; JOOSTE et al., 1986), doch sind nach der von DEMETER (1956a) ausgewerteten Literatur Beziehungen zwischen der Proteolytenzahl und der Butterqualität nur in Spezialfällen herzustellen. Im Widerspruch hierzu vertritt PARKER (1956) die Ansicht, daß zwischen der Zahl der Caseolyten und dem Verderbspotential von Butter "im allgemeinen eine vernünftige Korrelation" besteht. In diesem Sinne wurde die Zählung der caseolytischen Bakterien in Butter verschiedentlich zur Abschätzung der Haltbarkeit durchgeführt (JEZESKI und MACY, 1946; PARKER, 1956; DRUCE und THOMAS, 1959; LIGHTBODY, 1961) bzw. beschrieben (HARRIGAN und McCANCE, 1976d). Auch in der 15. Auflage von "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" wird zu diesem Zweck unter anderem die Zählung der proteolytischen Bakterien empfohlen (MARSHALL et al., 1985).

2.5 Nährböden zum Nachweis von Proteolyten

2.5.1 Allgemeines

Der bakteriologische Nachweis von Proteolyten beruht auf der Sichtbarmachung ihrer proteolytischen Enzymaktivität (KRAUS, 1960a). Den Nährböden werden als geeignete Substrate Gelatine, Milch, Casein (KRAUS, 1960a), Fleischsuspension (POHJA et al., 1960), Fischpreßsaft (KAZANAS, 1968) oder andere Proteinsubstrate zugesetzt (siehe Tabelle 9, Seite 44). Die Anwesenheit von proteolytischen Enzymen zeigt sich auf festen Nährböden meist in Form einer konzentrischen Aufhellung des trüben Mediums um eine Bakterienkolonie, welche auf dem Abbau des jeweiligen Eiweißes zu löslichen Verbindungen beruht (EIJK-

MAN, 1901; FRAZIER und RUPP, 1928; POHJA et al., 1960; KAZANAS, 1968; HARRIGAN und McCANCE, 1976b; LEE, 1976; KARNOP, 1982a; FRANK et al., 1985). Bei Gelatineagar-Medien ist erst nach Säureüberschichtung eine klare, von gefällter Gelatine umgebene Zone um die Kolonie zu erkennen (FRAZIER, 1926). MARTLEY et al. (1970) entwickelten einen klaren Natriumcaseinat-Agar, auf dem sich um caseolytische Kolonien herum das erste Stadium des Caseinabbaus als konzentrischer weißer Niederschlag von "Paracaseinen" zeigt. Durch stark proteolytische Keime kann das Präzipitat in unmittelbarer Nähe der Kolonie weiter zu löslichen Produkten abgebaut werden, wodurch eine innere klare Zone mit einem äußeren weißen Präzipitatrium entsteht.

Es ist grundsätzlich sinnvoll, mit der Zusammensetzung eines Nährbodens das zu untersuchende Lebensmittel zu simulieren (POHJA et al., 1960; KAZANAS, 1968; KARNOP, 1982a). Allerdings werden im Schrifttum oft Nachweismedien für Proteolyten beschrieben, ohne daß ihre Verwendung auf die Untersuchung eines bestimmten Probenmaterials eingeschränkt wird. Einen Überblick über in der Literatur beschriebene Nährböden zum Nachweis von Proteolyten gibt Tabelle 9 (Seite 44). Auf die in den eigenen Untersuchungen verwendeten Nährböden wird im Abschnitt 3.1.1.1 "Nährböden" näher eingegangen; dort findet sich ihre genaue Zusammensetzung.

2.5.2 Falsch-positive Ergebnisse auf Milchagarnährböden

Es ist seit langem bekannt, daß manche Bakterien auf milchhaltigen Nährböden Aufhellungszonen erzeugen, die nicht auf Proteolyse zurückzuführen sind, sondern auf eine "Lösung" der Milchproteine durch Stoffwechselprodukte der Bakterien (HASTINGS, 1904; SLOBODSKA-ZAYKOWSKA, 1925; FRAZIER und RUPP, 1928; LIGHTBODY, 1961; BAIRD-PARKER, 1963; ZAADHOF und TERPLAN, 1967; MARTLEY et al., 1970; ARNOLD und MURPHY, 1975). Deshalb müssen Milchagarnährböden vor dem Auswerten mit einer proteinfällenden Lösung überschichtet werden, wodurch nicht durch Proteolyse entstandene Aufhellungshöfe wieder trüb werden (HASTINGS, 1904). Damit kann man diese Kolonien aber nicht mehr weitergehend untersuchen (LEE, 1976). Während die Mehrzahl der Autoren diese scheinbare Proteolyse auf milchhaltigen Nährböden einer Säurebildung durch die Bakterien aufgrund der Vergärung von Zuckern zuschreibt (HASTINGS, 1904; SLOBODSKA-ZAYKOWSKA, 1925; FRAZIER und

und RUPP, 1928; MARTLEY et al., 1970), führen ARNOLD und MURPHY (1975) die "Lösung" von Milchproteinen auf "saure oder alkalische Stoffwechselprodukte" zurück, BAIRD-PARKER (1963) erklärt das Phänomen mit der Entstehung "alkalischer Stoffwechselprodukte" und zitiert dazu HASTINGS (1904), der allerdings Säurebildung als Ursache anführt. Da HASTINGS (1904) - neben SLOBODSKA-ZAYKOWSKA (1925), der ähnliche Versuche durchgeführt hat - der einzige der oben genannten Autoren ist, der seine Erklärungsversuche experimentell untermauert hat, soll auf seine Arbeit hier näher eingegangen werden. HASTINGS (1904) stellte fest, daß während des Wachstums einer säurebildenden Bakterienkolonie auf einer Milchagarplatte der Nährboden um die Kolonie klar wird. Bald trübt sich das Medium aber von innen nach außen wieder, wobei diese neue Trübung die ursprüngliche Trübung des Nährbodens letztlich übertrifft, so daß die Kolonie schließlich von einer breiten opaken Zone umgeben ist, welche von einer schmalen Aufhellungszone eingefaßt wird. Ein solches Bild zeigt auch ein in konzentrierter Milchsäure getränkter und auf den Nährboden aufgelegter Faden. Die transparente Zone stellt nun nach HASTINGS (1904) den Bereich dar, in dem das Casein aufgrund der geringeren Säurekonzentration als "ungesättigtes Salz" vorliegt, welches in Wasser unlöslich, aber in verdünnten Lösungen von Natriumchlorid - und als solche kann man auch den Nährboden ansehen - löslich ist. Im stärker getrübten Bereich unmittelbar um die Kolonie liegt das Casein wegen der höheren Säurekonzentration als unlösliches, "gesättigtes Salz", "Caseindilactat", vor. Tatsächlich scheint der Salzgehalt des Mediums für die Entstehung "unechter" Aufhellungszonen mitverantwortlich zu sein, denn auf einem ohne Salzzugabe hergestellten Milchagar trat nur die Trübungszone auf.

Tabelle 9: Nährböden zum Nachweis von Proteolyten

Protein-substrat	Bezeichnung des Nährbodens bzw. des Verfahrens	Konzentration des Proteinsubstrats	Untersuchungsmaterial	Anwendungsbereich	Prinzip: Proteolyse wird angezeigt durch:	Autor(en)
Gelatine	Nähr-gelatine	10 - 15%	Reinkulturen	Nachweis der Fähigkeit von Mikroorganismen zur Gelatineverflüssigung	Verflüssigung des Testmediums im Reagenzglas	HARRIGAN und McCANCE (1976b)
	Gelatine-agar	0,4%	Reinkulturen	Nachweis der Fähigkeit von Mikroorganismen zum Gelatineabbau	Klare, von gefällter Gelatine umgebene Zone um die Kolonie nach Überschichtung mit saurer Quecksilberchloridlösung ⁴ ; Niederschlag bzw. klare, von weißem Präzipitatring umgebene Zone um die Kolonie nach Überschichtung mit 1%iger Gerbsäure	FRAZIER (1926)
	Gelatine-agar, Modifikation des Gelatine-agers n. FRAZIER (1926)	0,4%	Reinkulturen	Nachweis der Fähigkeit von Bazillen zum Gelatineabbau	(wie beim Gelatineagar nach FRAZIER, 1926; Überschichtung mit saurer Quecksilberchloridlösung)	SMITH et al. (1952)
	Gelatine-agar	1%	Reinkulturen	Nachweis der Fähigkeit von gramnegativen Stäbchen zum Gelatineabbau	(wie beim Gelatineagar nach FRAZIER, 1926; Überschichtung mit saurer Quecksilberchloridlösung)	HECHELMANN und LEISINER (1969)
	Gelatine-agar	4%	Reinkulturen	Nachweis der Fähigkeit von Mikroorganismen zum Gelatineabbau	Trübungszone um die Kolonie (ohne Säureüberschichtung), vielleicht durch das Ausfallen von Polypeptiden	PITT und DEY (1970)
	"Soft-agar-gelatin overlay plate"	1,5% (in der oberflächlichen "soft-agar-gelatin"-Schicht)	Fischgewebe	Zählung proteolytischer Mikroorganismen	(Die Probenverdünnungen werden auf Nähragar ausgespatelt und mit einer dünnen Schicht Gelatineagar mit einem Agargehalt von 0,8% überschichtet.) Klare, von gefällter Gelatine umgebene Zone um die Kolonie nach Überschichtung mit 5%iger Essigsäure	LEVIN (1968)
Koagulierte Serum	Löfflers Serum	75%	Reinkulturen	Nachweis proteolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen	Verflüssigung des koagulierten Serums in Schrägröhrchen	HARRIGAN und McCANCE (1976b)
Koagulierte Ei-albumin	Koagulierte Ei-albumin	"1 kleiner Würfel hartgekochtes Eiklar in einem geeigneten Basismedium"	Reinkulturen	Nachweis proteolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen	Auflösung des koagulierten Eiweißes	BURNETT et al. (1957)

Tabelle 9 (Fortsetzung):

Protein-substrat	Bezeichnung des Nährbodens bzw. des Verfahrens	Konzentration des Protein-substrats	Untersuchungsmaterial	Anwendungsbereich	Prinzip: Proteolyse wird angezeigt durch:	Autor(en)
Eiklar + Dotter	Alkalisches Eimedium	ca. 2%	Reinkulturen	Nachweis proteolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen	Klärung der trüben Lösung	BURNETT et al. (1957)
Fleisch	"Hydrolysezonenverfahren"	2%	Reinkulturen	Nachweis der Fähigkeit von Mikroorganismen zum Abbau von Fleischeiweiß	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden	POHJA et al. (1960)
Roher, strahlensterilierter Fischpreßsaft	Fisch-rohpreßsaft-Agar-medium	10%	Reinkulturen, Isolate aus frischem und verderbendem Süßwasserfisch	Nachweis der Fähigkeit von Mikroorganismen zum Abbau von Fleischeiweiß	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden	KAZANAS (1968)
Hitzegefälltes sarkoplasmatisches Fisch-eiweiß	—	ca. 0,08% Trocken-eiweißgehalt	Reinkulturen, Isolate aus Seefisch	Nachweis der Fähigkeit von Mikroorganismen zum Abbau von Fisch-eiweiß	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden	KARNOP (1982a)
Magermilch	Lackmusmilch	ca. 99%	Reinkulturen	Nachweis caseolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen	1. Koagulieren der Milch, wobei die Lackmusfarbe blau bleibt (Süßgerinnung) 2. Klärung des Mediums. (Peptonisierung)	HARRIGAN und McCANCE (1976a, c)
	Magermilch-agar	ca. 5%	Molkereiwasser; Butter	Zählung und Isolierung caseolytischer Mikroorganismen	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden (offenbar keine Säureüberschichtung durchgeführt; vgl. Punkt 2.5.2)	JEZESKI und MACY (1946)
	Milch-agar, Magermilch-agar ²	ca. 10%	Reinkulturen (I, II, III); rohe und erhitzte Milch (IV); Butter, Margarine (V)	Nachweis caseolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen (I, II, III); Zählung proteolytischer Mikroorganismen (IV, V)	Nach Überschichtung mit saurer Quecksilberchloridlösung ¹ , 1%iger Salzsäure, 1%iger Gerbsäure oder 10%iger Essigsäure klar bleibende Zone um die Kolonie im trüben Nährboden	I, II) HASTINGS (1903, 1904) III) HARRIGAN und McCANCE (1976b, c) IV) FRANK et al. (1985) V) MARSHALL et al. (1985)

Tabelle 9 (Fortsetzung):

Protein-substrat	Bezeichnung des Nährbodens bzw. des Verfahrens	Konzentration des Protein-substrats	Untersuchungsmaterial	Anwendungsbereich	Prinzip: Proteolyse wird angezeigt durch:	Autor(en)
Magermilch	Milchagar	ca. 14% bis 25%	Reinkulturen	Nachweis caseolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden (offenbar keine Säureüberschichtung durchgeführt; vgl. Punkt 2.5.2)	EIJKMAN (1901)
	—	20%	Rohmilch	Isolierung psychropher Caseolyten	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden (offenbar keine Säureüberschichtung durchgeführt; vgl. Punkt 2.5.2)	PATEL et al. (1983a)
	Milchagar, Magermilchagar	ca. 30%	Reinkulturen (I, III, IV, V); Rohmilch (IV); Butter (II, III)	Nachweis caseolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen (I, III, IV, V); Isolierung psychropher Caseolyten (IV); Zählung caseolytischer Mikroorganismen (II, III)	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden (bei I, II, IV und V offenbar keine Säureüberschichtung durchgeführt; vgl. Punkt 2.5.2), bei III Auswertung erst nach Überschichtung mit saurer Quecksilberchloridlösung ⁴ , 1%iger Salzsäure oder 1%iger Gerbsäure)	I) SMITH et al. (1952) II) DRUCE und THOMAS (1959) III) HARRIGAN und McCANCE (1976b,d,e) IV) LAW et al. (1979) V) MUIR et al. (1979)
	modifiziertes Magermilchmedium	50%	Reinkulturen	Nachweis caseolytischer Eigenschaften von Enterobacteriaceae	Nach Überschichtung mit saurer Quecksilberchloridlösung ⁴ klar bleibende Zone um die Kolonie im trüben Nährboden	ARNOLD und MURPHY (1975)
	"Milk agar-marine agar two-layer plate" (Modifikation der "Soft-agar-gelatin overlay plate" von LEVIN, 1968)	20% (in der tiefen Schicht)	Reinkulturen; Meerwasser	Nachweis proteolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen; Isolierung und Zählung proteolytischer Mikroorganismen	(Zweischichtennährboden aus einer tiefen Indikatorschicht aus Milchagar und einer oberflächlichen Schicht aus vollkonzentriertem Seewasseragar.) Klare Zone um die Kolonie in der trüben Indikatorschicht (keine Säureüberschichtung durchgeführt; vgl. Punkt 2.5.2)	SIZEMORE und STEVENSON (1970)

Tabelle 9 (Fortsetzung):

Protein-substrat	Bezeichnung des Nährbodens bzw. des Verfahrens	Konzentration des Proteinsubstrats	Untersuchungsmaterial	Anwendungsbereich	Prinzip: Proteolyse wird angezeigt durch:	Autor(en)
Fettarme Milch	Milchagar nach BAIRD-PARKER (1963)	20%	Reinkulturen (I); rohe und pasteurisierte Milch (II)	Nachweis caseolytischer Eigenschaften von Staphylococcus, Micrococcus und Sarcina spp. (I); Zählung caseolytischer Mikroorganismen (II)	Nach Überschichtung mit saurer Quecksilberchloridlösung ¹ oder 1%iger Salzsäure klar bleibende Zone um die Kolonie im trüben Nährboden	I) BAIRD-PARKER (1963) II) ZAADHOF und TERPLAN (1967)
"Reines Casein"	—	(keine Angaben)	Reinkulturen	Nachweis caseolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden	EIJKMAN (1901)
Casein nach Hammarsten	Caseinagar nach FRAZIER und RUPP (1928)	0,35%	Reinkulturen	Nachweis caseolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden	FRAZIER und RUPP (1928)
	Caseinagar n. FRAZIER und RUPP (1928), modifiziert n. BRANDT (1939)	0,35%	Magermilchpulver, rekonstituierte Milch (II)	Zählung caseolytischer Mikroorganismen (II)	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden (II)	I) BRANDT (1939) II) CIBLIS und SCHWARZ (1962)
	"Calcium-Caseinat-Agar nach FRAZIER a. RUPP (1928), modifiziert von BRANDT (1939)" ²	0,25%	"Nahrungsmittel und anderes Untersuchungsmaterial"	Nachweis und Zählung proteolytischer Mikroorganismen	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden (zur Kontrastverstärkung können die Platten vor dem Ablesen mit 1n Essigsäure überschichtet werden)	NÄHRBÖDEN HANDBUCH MERCK (1986)
	"Calcium-Caseinat-Agar nach FRAZIER und RUPP, modifiziert" ²	0,25%	"Milch u. Milchprodukte, Wasser und anderes Untersuchungsmaterial"	Nachweis und Zählung proteolytischer Mikroorganismen	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden (zur Kontrastverstärkung können die Platten vor dem Ablesen mit verdünnter Essigsäure übergossen werden)	"OXOID INFORMIERT"

Tabelle 9 (Fortsetzung):

Protein-substrat	Bezeichnung des Nährbodens bzw. des Verfahrens	Konzentration des Proteinsubstrats	Untersuchungsmaterial	Anwendungsbereich	Prinzip: Proteolyse wird angezeigt durch:	Autor(en)
Casein nach Hammarsten	Calcium-Kaseinat-Agar, Calcium-Casein-peptonagar nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958) ²	1,06%	Reinkulturen (III, IV); Milch (I, II, III), Milchprodukte, Wurst, Lebensmittel allgemein (III)	Nachweis proteolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen (III, IV); Nachweis und Zählung proteolytischer Mikroorganismen (I, II, III)	Klare Zone um die Kolonie im trüben Nährboden	I) INSTITUT F. TIER-ÄRZTL. LEBENSMITTELKUNDE UND MILCH-HYGIENE DER TIER-ÄRZTL. HOCHSCHULE HANNOVER (1958) II) SCHÖNBERG und KRAUS (1958) III) KRAUS (1960a) IV) KRAUS (1960b)
Natrium-Caseinat	Standard Methods caseinate agar (SMCA) ²	1,0%	Reinkulturen; Rohmilch	Nachweis proteolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen; Zählung proteolytischer Mikroorganismen, zugleich Bestimmung der Gesamtkeimzahl möglich	Weißes Präzipitat um die Kolonie im transparenten Nährboden; bei stark proteolytischen Keimen durch Abbau des Präzipitats zu löslichen Produkten äußerer weißer Ring und innere klare Zone um die Kolonie	MARTLEY et al. (1970)

Anmerkungen: ¹⁾ Die saure Quecksilberchloridlösung besteht aus 15 g HgCl₂, 20 ml konzentrierter HCl und 100 ml Wasser (FRAZIER, 1926).

²⁾ In den eigenen Untersuchungen verwendeter Nährboden; genaue Zusammensetzung im Abschnitt 3.1.1.1.1 "Zusammensetzung der Nährböden".

3. Eigene Untersuchungen

Zur Zählung von Caseolyten in Milch und Milchprodukten werden im wesentlichen zwei Gruppen von Nährböden verwendet: Trübe Nährböden, in denen durch vollständige Hydrolyse des Substrates Casein Aufhellungszonen um die Kolonien entstehen bzw. klare Nährböden, in denen durch einen primär unvollständigen Caseinabbau Präzipitate erzeugt werden. Im ersten Abschnitt der eigenen Untersuchungen wurden Vertreter beider Nährbodengruppen vergleichend mit Reinkulturen saprophytärer und pathogener Keime hinsichtlich ihrer Elektivität geprüft.

Der zweite Abschnitt befaßte sich mit Untersuchungen zur Produktivität verschiedener Nährböden bei der Zählung von Caseolyten in Rohmilch, wobei auch eine geeignete Bebrütungstemperatur (30 °C bzw. 37 °C) ermittelt werden sollte.

Im dritten Versuchsabschnitt wurden solche Milchtrockenprodukte, die die Anforderungen der Verordnung über diätetische Lebensmittel zu erfüllen haben, mit dem dort vorgeschriebenen Calcium-Caseinat-Agar sowie mit Nährböden des Handels und eigener Herstellung untersucht, um zu prüfen, ob sich die mit Rohmilch gewonnenen Ergebnisse an diesem Material bestätigen ließen. Verschiedene der dabei isolierten Kulturen wurden identifiziert.

3.1 Untersuchungen zur Elektivität klarer und trüber Nährböden zum Nachweis von Proteolyten

3.1.1 Material und Methodik

3.1.1.1 Nährböden

3.1.1.1.1 Zusammensetzung der Nährböden

In die Untersuchungen wurden fünf konventionelle trübe Nährböden zum Nachweis von Proteolyten einbezogen: Der nach der Anlage 5 der Verordnung über diätetische Lebensmittel vom 20. Juni 1963 in der Fassung vom 21. Januar 1982 für die Untersuchung von Säuglingsnahrung vorgeschriebene "Calcium-Kaseinat-Agar" nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958) (von KRAUS, 1960a, als "Calcium-Caseinpeptonagar" bezeichnet; im folgenden mit CD abgekürzt; "D" steht für "dampftopferhitzte Lösung 1"), derselbe Nährboden in einer geringfügigen Modifikation, wobei die Lösung 1 autoklaviert wurde (im folgenden mit CA

abgekürzt; "A" steht für "autoklavierte Lösung 1"), ein "Calcium-Caseinat-Agar nach FRAZIER a. RUPP (1928), modifiziert von BRANDT (1939)" der Firma Merck (im folgenden mit CM abgekürzt), ein "Calcium-Caseinat-Agar nach FRAZIER und RUPP, modifiziert" der Firma Oxoid (im folgenden mit CO abgekürzt) und ein 10%iger Magermilchagar (im folgenden mit MA abgekürzt). Als klare Proteolytennährböden fanden der "Standard Methods caseinate agar" (SMCA) von MARTLEY et al. (1970) sowie verschiedene Caseinatnährböden eigener Rezeptur Verwendung.

Zusammensetzung und Herstellung des Calcium-Caseinpeptonagars nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958) werden in Anlage 5 der Verordnung über diätetische Lebensmittel vom 20. Juni 1963 in der Fassung vom 21. Januar 1982 folgendermaßen angegeben:

"Nach Herstellung geeigneter Verdünnungen mit sterilen Verdünnungsmitteln wird unter aerober Bebrütung bei 37 °C mit Calcium-Kaseinat-Agar nach folgendem Herstellungsrezept gearbeitet:

3,5 g Caseinum purum Hammarsten (Pulver) werden in 50 ml destilliertem Wasser eingeweicht. Nach fünfzehn Minuten werden 100 ml gesättigtes Kalkwasser (1 Teil Calciumhydroxid und 104 Teile destilliertes Wasser, nach Absättigung zweimal mit gleichem Filter filtrieren) hinzugefügt und bis zur Lösung des Kaseins durchgeschüttelt (Lösung 1).

Lösung 2 besteht aus 20 ml Bouillon (auf 1 000 ml destilliertes Wasser 3 g Fleischextrakt, 5 g Pepton aus Fleisch tryptisch verdaut, 5 g Kochsalz), 10 ml Chlorcalciumlösung (0,15%ig), 10 ml Phosphatlösung (aus 1,05 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 0,35 % K_2HPO_4 bestehend), 460 ml destilliertem Wasser und 4,5 % Agar. Im Dampftopf lösen. Einstellen auf pH = 7,6. Lösung dann zehn Minuten autoklavieren. Die Lösung 1 kommt dreißig Minuten in den Dampftopf. Nach Abkühlung auf 50 °C wird Lösung 1 mit der auf 50 °C vorgewärmten Lösung 2, der auf 150 ml je 30 ml einer frisch angesetzten Kaseinpeptonlösung (tryptisch verdaut) vor dem Vermischen hinzugefügt worden sind, zu gleichen Teilen vermischt und in Platten ausgegossen."

Während in der ursprünglichen Fassung der Diät-Verordnung vom 20. Juni 1963 für die Herstellung der Phosphatlösung " $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ " angegeben wurde, heißt es ab der Neufassung vom 24.10.1975 " $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ". Da diese Ände-

nung in keiner der bis zu diesem Zeitpunkt erlassenen vier Änderungsverordnungen aufgeführt wird, liegt möglicherweise ein Druckfehler vor. In den eigenen Untersuchungen wurde wasserfreies Na_2HPO_4 verwendet, da $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ nicht erhältlich war, und die Menge auf $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ bezogen ($1,05 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ entsprechen $0,93 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4$). Für die Caseinpeptonlösung wird in der Anlage 5 der Diät-Verordnung keine Konzentration genannt. Gemäß den Angaben von SCHÖNBERG und KRAUS (1958) wurde eine 10%ige Lösung eingesetzt.

Die zur Herstellung des Calcium-Caseinpeptonagars nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958) verwendeten Substanzen sind mit Hersteller und Bestellnummer in Tabelle 10 aufgelistet.

Die Zusammensetzung der übrigen übernommenen Nährböden findet sich in der Tabelle 11.

Nach eigener Rezeptur wurden verschiedene klare Caseinatnährböden jeweils aus 1 Teil doppelt konzentrierter Nähragarlösung ("Nutrient agar", Fa. Oxoid CM 3; Zusammensetzung vergleiche unter "10%iger Magermilchagar", Tab. 11; $56 \text{ g Trockennährboden/Liter}$) und 1 Teil Calcium-, Kalium- oder Natriumcaseinatlösung unterschiedlicher Konzentration (Firmenmuster) gemischt.

3.1.1.1.2 Herstellung der Nährböden

Der Calcium-Caseinpeptonagar (CD) nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958) wurde gemäß Anlage 5 der Diät-Verordnung hergestellt (siehe Abschnitt 3.1.1.1.1). Zur Lösung des Caseins in dem gesättigten Kalkwasser wurde die Lösung 1 mit Magnetstabrührer 1–2 h gerührt. Die Einstellung des pH-Wertes der Lösung 2 erfolgte mit 1 n Natronlauge bei $60–65^\circ\text{C}$. Aus arbeitstechnischen Gründen wurde die Lösung 2 nicht, wie in Anlage 5 der Diät-Verordnung vorgeschrieben, 10 min, sondern 15 min bei 121°C autoklaviert. Die Caseinpeptonlösung, für die die Arbeitsvorschrift der Diät-Verordnung keine Sterilisationsbedingungen enthält, wurde ebenfalls 15 min bei 121°C autoklaviert. Lösung 1 und Lösung 2 wurden vor der Erhitzung im Dampftopf (Lösung 1) bzw. dem Autoklavieren (Lösung 2) getrennt in Flaschen abgefüllt und nach dem Erhitzungsprozeß frisch verwendet oder bei einer Temperatur von 4°C bevorratet. Das Mischen der drei Nährbodenkomponenten Lösung 1, Lösung 2 und Caseinpeptonlösung unmittelbar vor dem Gießen erfolgte abweichend von der Arbeitsvor-

Tabelle 10: Zur Herstellung des Calcium-Caseinpeptonagars nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958) verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller und Bestellnummer
Casein nach Hammarsten	Fa. Merck 2242
Ca(OH) ₂	Fa. Merck 2047
Fleischextrakt ("'Lab-Lemco' Powder")	Fa. Oxoid L 29
Pepton aus Fleisch ("Bacteriological peptone")	Fa. Oxoid L 37
NaCl	Fa. Merck 6404
CaCl ₂	Fa. Merck 2388
Na ₂ HPO ₄ wasserfrei	Fa. Merck 6586
K ₂ HPO ₄	Fa. Merck 5104
Agar ("Agar No. 1")	Fa. Oxoid L 11
Caseinpepton, tryptisch verdaut ("Tryptone")	Fa. Oxoid L 42

Tabelle 11: Zusammensetzung der für den Nachweis von Proteolyten verwendeten, in der Literatur beschriebenen bzw. im Handel erhältl. Nährböden

"Calcium-Caseinat-Agar nach FRAZIER a. RUPP (1928), modifiziert von BRANDT (1939)" der Firma Merck (Art. Nr. 5409) (NÄHRBÖDEN HANDBUCH MERCK, 1986) bzw. "Calcium-Caseinat-Agar nach FRAZIER und RUPP, modifiziert" der Firma Oxoid (Art. Nr. CM 639) ("OXOID INFORMIERT") (beide Nährböden haben die gleiche mengenmäßige Zusammensetzung):

Pepton aus Fleisch	5,0 g
Fleischextrakt	3,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Casein nach Hammarsten	2,5 g
Calciumhydroxid	0,15 g
Calciumchlorid	0,05 g
Agar	13,5 g
Aqua dest	1 000 ml
pH	7,0 ± 0,2

Tabelle 11 (Fortsetzung):

10%iger Magermilchagar (HARRIGAN und McCANCE, 1976b, e; FRANK et al., 1985):

Rekonstituierte Magermilch	100 ml
Bestehend aus: Magermilchpulver	
(Fa. Oxoid L 31)	10 g
Aqua dest.	100 ml
Nutrient agar (Fa. Oxoid CM 3)	1 000 ml
Bestehend aus: "Lab-Lemco" Pulver	1,0 g
Hefeextrakt	2,0 g
Pepton	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Aqua dest.	1 000 ml
pH	7,4

Standard Methods caseinate agar (SMCA) (MARTLEY et al., 1970):

Caseinpepton, tryptisch verdaut ("Tryptone",	
Fa. Oxoid L 42)	5,0 g
Hefeextrakt (Fa. Oxoid L 21)	2,5 g
Glucose-Monohydrat (Fa. Merck 8342)	1,1 g
(entspricht Glucose wasserfrei	1,0 g)
Natrium-Caseinat (Firmenmuster)	10,0 g
Trinatriumcitrat-2-Hydrat (Fa. Merck 6448)	4,41 g
CaCl ₂ x 6 H ₂ O (Fa. Merck 2072)	4,38 g
Agar ("Agar No. 1", Fa. Oxoid L 11)	15,0 g
Aqua dest.	1 000 ml

schrift der Diät-Verordnung bei einer Temperatur der Lösungen von 55 – 60 °C, da bei der vorgeschriebenen Temperatur von 50 °C oft keine homogene Mischung zu erzielen war. Wegen der Zähflüssigkeit der Lösung 2 wurden zum Mischen die Caseinpeptonlösung und die Lösung 1 zur Lösung 2 hinzugegeben. Der Calcium-Caseinpeptonagar nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958) wurde auch in einer geringfügigen Modifikation (CA) hergestellt, wobei die Lösung 1 nicht, wie es die Vorschrift der Anlage 5 der Diät-Verordnung verlangt, 30 min im Dampftopf erhitzt, sondern 15 min bei 121 °C autoklaviert wurde.

Der Calcium-Caseinat-Agar der Firma Merck (CM) bzw. der Calcium-Caseinat-Agar der Firma Oxoid (CO) wurden in der vorgeschriebenen Konzentration von 29 g Trockennährboden/l in destilliertem Wasser suspendiert und – abweichend von den (für beide Nährböden sinngemäß gleichen) Herstellerangaben – auf einer Heizplatte mit Magnetstabrührer aufgekocht. Danach wurde der CM zur Rückhaltung grober Partikel durch mehrere Lagen Gaze filtriert. Beide Medien wurden mit einem Magnetstab in Erlenmeyerkolben abgefüllt, 15 min bei 121 °C autoklaviert und frisch verwendet oder bei 4 °C gelagert. Vor dem Gießen wurde das am Boden der Erlenmeyerkolben entstandene Sediment auf einem Magnetstabrührer wieder suspendiert.

Für den 10%igen Magermilchagar (MA) wurden die beiden Komponenten, Nähragar und Magermilch, 15 min bei 121 °C getrennt in Erlenmeyerkolben autoklaviert und erst unmittelbar vor dem Gießen mit 55 – 60 °C gemischt.

Der Standard Methods caseinate agar (SMCA) wurde nach den Angaben von MARTLEY et al. (1970) hergestellt: In der einen Hälfte einer 0,015molaren Natriumcitratlösung (4,41 g Trinatriumcitrat-2-Hydrat/l) wurde das Natriumcaseinat durch 1- bis 2stündiges Rühren mit Magnetstabrührer gelöst. In der anderen Hälfte der Natriumcitratlösung wurden Caseinpepton, Hefeextrakt, Glucose-Monohydrat und Agar suspendiert und auf einer Heizplatte mit Magnetstabrührer aufgekocht. Anschließend wurde die vorgewärmte Natriumcaseinatlösung zu dieser Agarlösung zugegeben, beide Komponenten wurden mit Magnetstabrührer gemischt, der Magnetstab in der Lösung belassen und diese schließlich 15 min bei 121 °C autoklaviert. Eine $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung (4,38 g $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ /20 ml) wurde getrennt autoklaviert und erst vor dem Gießen der Natriumcaseinat-Agar-Lösung zugegeben (20 ml $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung/1 000 ml Natriumcaseinat-Agar-Lösung).

Für die nach eigener Rezeptur hergestellten klaren Caseinatnährböden wurden die doppelt konzentrierte Nähragarlösung mit Magnetstab in Erlenmeyerkolben und die durch 1- bis 2stündiges Rühren mit Magnetstabrührer hergestellten Caseinatlösungen getrennt 15 min bei 121 °C autoklaviert. Vor Gebrauch wurde der Nähragarlösung die gleiche Menge Caseinatlösung zugegeben, bei einer Temperatur der beiden Komponenten von 55–60 °C, und beide Lösungen mit Magnetstabrührer gemischt.

3.1.1.2 Vergleichende Untersuchungen mit Reinkulturen an trüben und klaren Nährböden zum Nachweis von Proteolyten

3.1.1.2.1 Kulturen

In die Untersuchungen wurden Isolate aus Vorzugsmilch sowie Kulturen der institutseigenen Stammsammlung einbezogen. Letztere sind in Tabelle 12 (siehe Seite 59) aufgeführt.

Zur Isolierung von Kulturen aus Vorzugsmilch wurden mehrere Milchproben gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (Vorbereitung der Proben für mikrobiologische Untersuchungen, Verfahren für Milch und flüssige Milchprodukte, L 01.00 – 1 vom September 1980) vorbereitet, im Gußplatten- und im Oberflächenverfahren auf verschiedenen klaren Caseinatnährböden eigener Rezeptur angesetzt und bis zu 72 h bei 37 °C bebrütet. Von diesen Platten wurden caseolytisch aktive Kulturen isoliert. Als caseolytisch aktiv wurden nur solche Kolonien gewertet, die auf den klaren Nährböden ein deutliches weißes Präzipitat von mindestens 1 mm Breite um die Kolonie oder einen äußeren weißen Präzipitatring mit einem inneren klaren Hof um die Kolonie aufwiesen (siehe Abschnitt 2.5.1, Seite 41).

3.1.1.2.2 Herstellung, Bebrütung und Auswertung der Reinkulturausstriche

Von den Reinkulturen wurden jeweils Verdünnungsausstriche auf mit 17–20 ml Nährboden gegossenen und 90 min bei 42 °C vorgetrockneten Platten angefertigt.

Zuerst wurden Kolonien, die sich auf klaren Caseinatnährböden der Vorzugsmilchproben-Ansätze als caseolytisch erwiesen, direkt wiederum auf klare Caseinatnährböden bzw. MA ausgestrichen:

Neun tiefe (d.h. unter der Agaroberfläche gelegene) "Präzipitatkolonien" (d.h. Kolonien mit Präzipitat, aber ohne Ringbildung) auf klare Caseinatnährböden eigener Rezeptur.

51 "Präzipitat"- und "Präzipitatring"-Kolonien auf MA.

Danach wurden in drei Versuchsreihen Ausstriche von Kulturen der instituts-eigenen Stammsammlung (siehe Tabelle 12, Seite 59) auf SMCA, CO und MA hergestellt:

Elf Kulturen zweimal auf SMCA und MA.

43 Kulturen auf SMCA, CO und MA.

Die Isolate von den klaren Caseinatnährböden wurden bei 37 °C bis zu 72 h bebrütet. Die Bebrütung der Stämme aus der Stammsammlung erfolgte bis zu 72 h bei 30 °C.

Die Beurteilung der Ausstriche geschah täglich. Als caseolytisch aktiv wurde eine Kultur dann eingestuft, wenn sie im Falle des MA oder des CO einen völlig klaren Hof von mindestens 1 mm Breite um die Kolonie aufwies (beim MA erst nach 10minütiger Übersichtung mit 10 ml 10%iger Essigsäure) bzw. wenn sie auf einem klaren Nährboden von einem deutlichen weißen Präzipitat von mindestens 1 mm Breite oder von einer äußeren weißen Präzipitatzone mit einem inneren klaren Hof umgeben war. Die Säureüberschichtung des MA erfolgte in der letzten Versuchsreihe mit den Kulturen aus der Stammsammlung grundsätzlich am Versuchsende nach 72 h, in allen anderen Fällen zu dem jeweiligen Zeitpunkt, zu dem die betreffenden Kolonien erstmals einen klaren Hof zeigten. Die 10%ige Essigsäure wurde aus 100 ml 100%iger Essigsäure (Fa. Merck 63 E) und Aqua dest. ad 1000 ml hergestellt.

3.1.1.3 Vergleichende Untersuchungen mit *Bacillus cereus*-Stämmen an drei verschiedenen trüben Caseinatnährböden

Als Nährböden kamen CD, CA und CM zum Einsatz. Auf mit 17–20 ml Nährboden gegossenen und 90 min bei 42 °C vorgetrockneten Platten wurden Verdünnungsausstriche von 20 *Bacillus cereus*-Stämmen der institutseigenen Stammsammlung angefertigt. Pro Stamm und Nährboden wurden zwei Ausstrichplatten hergestellt und eine bei 30 °C, die andere bei 37 °C 72 h bebrütet.

Die Auswertung erfolgte nach 24, 48 und 72 h. Registriert wurde die Ausbildung von Aufhellungshöfen (Breite mindestens 0,5 mm), welche in diesem speziellen Fall nicht vollkommen klar zu sein brauchten. Jedoch wurde die Klarheit der Höfe (völlig klar/getrübt) vermerkt, ebenso ihre Begrenzung (scharf/unscharf) und die Breite.

3.1.2 Ergebnisse

3.1.2.1 Ergebnisse der Untersuchungen mit Reinkulturen an trüben und klaren Nährböden zum Nachweis von Proteolyten

3.1.2.1.1 Versuche mit Isolaten aus Vorzugsmilch

Von den neun von klaren Caseinatnährböden isolierten und wiederum auf klare Caseinatnährböden ausgestrichenen tiefen "Präzipitatkolonien" hatten nach 72-stündiger Bebrütung sieben einen Präzipitatring ausgebildet, zwei waren gewachsen, ohne den Nährboden zu verändern.

Die 51 von klaren Caseinatnährböden isolierten und auf MA ausgestrichenen "Präzipitat"- und "Präzipitatring"-Kolonien verhielten sich folgendermaßen:

Caseolyse angezeigt auf MA:	37 Kulturen
Keine Caseolyse angezeigt auf MA:	12 Kulturen
Nicht gewachsen auf MA:	2 Kulturen

3.1.2.1.2 Versuche mit Kulturen aus der Stammsammlung

Das Verhalten ein und derselben Kultur auf verschiedenen Nährböden war in vielen Fällen uneinheitlich (Tabelle 12). Von den auf MA, CO und SMCA untersuchten 43 Stämmen ließen lediglich elf (*Flavobacterium odoratum* 1, *Citrobacter freundii* 1, *Serratia marcescens* 2, *Staphylococcus aureus* 30, *Bacillus alvei* 1, *Bacillus cereus* 5, *Bacillus cereus* 6, *Bacillus licheniformis* 24, *Bacillus pumilus* 25, *Bacillus subtilis* 27 und *Bacillus* sp. 1) auf allen drei Nährböden caseolytische Eigenschaften erkennen, indem sie auf MA und CO Aufhellungszonen, auf SMCA dagegen ein Präzipitat erzeugten. Fünf weitere Stämme (*Aeromonas hydrophila* 1, "*Aeromonas liquefaciens*" 2, *Staphylococcus aureus* 1, *Bacillus mycoides* 13 und *Bacillus* sp. 2) zeigten auf MA und CO Aufhellungs-

höfe und bildeten auf SMCA kein Präzipitat, führten aber in dem letztgenannten, ohnehin relativ klaren Nährboden zu einer weiteren Aufhellung des Mediums um die Kolonien. Zehn Kulturen waren auf einem oder zwei der drei genannten Medien caseolytisch aktiv, vier davon (*Pseudomonas cepacia* 1, *Serratia liquefaciens* 3, *Micrococcus luteus* 4 und *Bacillus sphaericus* 26) nur auf den trüben Nährböden MA und CO, eine (*Staphylococcus epidermidis* 2) ausschließlich auf SMCA. Von den neun Kulturen, die lediglich an SMCA und MA geprüft wurden, waren zwei (*Pseudomonas aeruginosa* 2 und *Staphylococcus aureus* 21) auf beiden Nährböden positiv, ein weiterer Stamm (*Pseudomonas* 8) erzeugte auf MA Aufhellungszonen und führte auf SMCA ohne Präzipitatabildung zu einer weiteren Klärung des Mediums um die Kolonie, drei Stämme (*Escherichia coli* 6, *Escherichia coli* 7 und *Bacillus laterosporus* 6) erwiesen sich nur auf MA als caseolytisch aktiv, die restlichen wuchsen auf beiden Nährböden reaktionslos. Auffallend war, daß mehrere Kulturen ausschließlich auf SMCA eine wechselnde Koloniemorphologie (glatt-glänzend bzw. rauh-trocken) zeigten.

3.1.2.2 Ergebnisse der Untersuchungen mit *Bacillus cereus*-Stämmen an drei verschiedenen trüben Caseinatnährböden

Von den 20 auf CD, CA und CM ausgestrichenen *Bacillus cereus*-Stämmen ließen auf CA und CM 19 bzw. 20 Kulturen nach 48 h caseolytische Eigenschaften erkennen, während auf CD nach derselben Bebrütungsdauer bei 30 °C 17 Kulturen und bei 37 °C nur 13 Kulturen als Caseolyten registriert wurden (Tabelle 13). Dabei änderten sich die Zahlen der als Caseolyten angezeigten Kulturen am dritten Tag der Bebrütung nicht mehr wesentlich.

Während bei CD und CA getrühte Aufhellungshöfe vorkamen, waren diese bei CM stets vollständig klar. Auf CA und CM waren die Höfe meistens scharf begrenzt, dagegen gingen sie auf CD in mehr als der Hälfte der Fälle fließend in das unveränderte Medium über. Stets nahm die Breite der Aufhellungszonen in der Reihenfolge CM > CA > CD deutlich ab.

Bei einer Bebrütungstemperatur von 37 °C waren die Aufhellungshöfe auf CA und CM breiter als bei 30 °C, während im Falle des CD keine einheitliche Auswirkung der Bebrütungstemperatur auf die Hofbreite zu erkennen war. Der Einfluß der Temperatur auf die Zahl der als Caseolyten angezeigten Stämme sowie auf Klarheit und Begrenzung der Höfe stellte sich uneinheitlich dar.

Tabelle 12: Verhalten von Kulturen der institutseigenen Stammsammlung auf verschiedenen Nährböden zum Nachweis von Proteolyten

Bezeichnung der einzelnen Kulturen in der Stammsammlung (gegebenenfalls mit DSM- bzw. ATCC-Nummer)	Nach spätestens 72 h Caseolyse angezeigt auf		
	MA	SMCA	CO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2	+	+	NU ¹
<i>Pseudomonas cepacia</i> 1	+	- WK ²	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2: DSM 50 090	-	- WK	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 3	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	- WK	+
<i>Pseudomonas</i> 8	+	(+) ³	NU
<i>Alteromonas putrefaciens</i> 1	-	-	+
<i>Flavobacterium odoratum</i> 1	+	+	+
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2	+	+	-
" <i>Alcaligenes viscolactis</i> " 1	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 2	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 3	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 4	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 5	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 6	+	-	NU
<i>Escherichia coli</i> 7	+	-	NU
<i>Citrobacter freundii</i> 1	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> 2	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> 3	-	-	-
<i>Enterobacter sakazakii</i> 4	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i> 3: DSM 30 063	+	- WK	+
<i>Serratia marcescens</i> 2	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i> 1	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> 4: DSM 788 = ATCC 14 153	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> 1	+	(+)	+
" <i>Aeromonas liquefaciens</i> " 2	+	(+)	+
<i>Micrococcus luteus</i> 4: ATCC 10 240	+	-	+
<i>Micrococcus roseus</i> 6: ATCC 177	-	- WK	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	-	-	NU
<i>Staphylococcus aureus</i> 21	+	+	NU
<i>Staphylococcus aureus</i> 30	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	+	(+)	+

Tabelle 12 (Fortsetzung):

Bezeichnung der einzelnen Kulturen in der Stammsammlung (gegebenenfalls mit DSM- bzw. ATCC-Nummer)	Nach spätestens 72 h Caseolyse angezeigt auf		
	MA	SMCA	CO
Staphylococcus epidermidis 2: ATCC 14 990	-	+	-
Streptococcus bovis 1	-	-	NU
Enterococcus durans 8: ATCC 11 639	-	-	-
Enterococcus faecalis 2	-	-	NU
Enterococcus faecium 4: ATCC 27 164	-	-	-
Bacillus alvei 1	+	+	+
Bacillus cereus 5	+	+	+
		WK	
Bacillus cereus 6	+	+	+
		WK	
Bacillus circulans 19	-	-	-
Bacillus laterosporus 6	+	-	NU
Bacillus laterosporus 21: ATCC 6 457	+	+	-
Bacillus lentus 22: ATCC 10 841	-	-	-
Bacillus licheniformis 24	+	+	+
Bacillus mycoides 13	+	(+)	+
Bacillus polymyxa 38: ATCC 10 401	+	-	-
		WK	
Bacillus pumilus 25	+	+	+
		WK	
Bacillus sphaericus 26: ATCC 245	+	-	+
		WK	
Bacillus subtilis 27	+	+	+
Bacillus sp. 1	+	+	+
		WK	
Bacillus sp. 2	+	(+)	+

Anmerkungen:

1) NU = nicht untersucht.

2) WK = wechselnde Koloniemorphologie auf SMCA.

3) (+) = kein Präzipitat auf SMCA, nur weitere Aufhellung
des (nahezu völlig klaren) Nährbodens um die Kolonie.

Tabelle 13: Verhalten von 20 *Bacillus cereus*-Stämmen auf drei trüben Caseinatnährböden

Nährboden	Temperatur	Zeit	Von 20 Kulturen erwiesen sich als caseolytisch:	Kulturen mit völlig klarem/getrübtem Hof	Kulturen mit scharf/unscharf begrenztem Hof	Hofbreite in mm maximal/arithmet. Mittel
CD	30°C	24 h	9	5/4	2/7	1,0
		48 h	17	15/2	10/7	2,5
		72 h	17	17/0	9/8	3,0
	37°C	24 h	13	10/3	5/8	1,5
		48 h	13	11/2	4/9	2,0
		72 h	14	14/0	6/8	4,0
CA	30°C	24 h	17	16/1	14/3	2,0
		48 h	20	19/1	17/3	4,0
		72 h	20	18/2	18/2	5,0
	37°C	24 h	19	15/4	14/5	3,0
		48 h	19	19/0	18/1	5,0
		72 h	18 ¹	18/0	18/0	9,0
CM	30°C	24 h	19	19/0	17/2	4,0
		48 h	19	19/0	16/3	7,0
		72 h	19	19/0	17/2	10,0
	37°C	24 h	18	18/0	17/1	5,0
		48 h	19	19/0	13/6	10,0
		72 h	19	19/0	16/3	15,0

Anmerkung: 1) Eine Kultur überwuchs den schmalen Hof.

3.2 Vergleich der Produktivität verschiedener Nährböden bei der Zählung von Caseolyten in Rohmilch

3.2.1 Material und Methodik

3.2.1.1 Milchproben

Zur Ermittlung der geeigneten Bebrütungstemperatur für die Untersuchung von Rohmilch auf Caseolyten gelangten insgesamt 22 Proben von Vorzugsmilch sowie 17 Proben von Molkereianlieferungsmilch zur Untersuchung. Zum Vergleich der Produktivität von fünf verschiedenen Nährböden bei der Bestimmung des Caseolytengehaltes von Rohmilch bei einer Bebrütungstemperatur von 30 °C wurden 150 Proben von Molkereianlieferungsmilch untersucht.

Die Vorzugsmilchproben stammten alle aus dem gleichen Erzeugerbetrieb und wurden im August und September 1985 erworben. Die Anlieferungsmilchproben wurden in der Zeit von Oktober 1985 bis Februar 1986 gezogen. Die Probenahme erfolgte stets in der gleichen Molkerei; dabei entstammten die einzelnen Proben jeweils verschiedenen Tanks der Milchwagen.

3.2.1.2 Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Nährböden

Verwendet wurden CD, CA, CM, CO und MA, wie im Abschnitt 3.1.1.1 (Seite 49) beschrieben.

3.2.1.3 Untersuchung der Vorzugsmilch- und Anlieferungsmilchproben

3.2.1.3.1 Vorbereitung, Ansatz und Bebrütung

Die Milchproben wurden bis zur Untersuchung bei einer Temperatur von 4 °C gelagert. Die Vorbereitung der Proben richtete sich nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (Vorbereitung der Proben für mikrobiologische Untersuchungen. Verfahren für Milch und flüssige Milchprodukte, L 01.00 - 1 vom September 1980).

Tabelle 14: Bei der Untersuchung der Vorzugsmilch- und Anlieferungsmilchproben angesetzte Probenverdünnungen, die verwendeten Nährböden sowie gegebenenfalls durchgeführte Säureüberschichtung

Untersuchung von	Angesetzte Verdünnungsstufen	Verwendete Nährböden	Säureüberschichtung ¹ durchgeführt bei
Vorzugsmilch bei 30°C und 37°C: Probe 1 - 16 Probe 17 - 22	10 ⁻¹ bis 10 ⁻⁴ 10 ⁻² bis 10 ⁻⁶	Probe 1 - 10: CD Probe 11 - 22: CM und MA (bis für jeden Nährboden 10 Proben auswertbar waren)	allen Nährböden
Anlieferungsmilch bei 30°C und 37°C: Probe 1 - 17	10 ⁻³ bis 10 ⁻⁶	Probe 1 - 7: CM und MA Probe 8 - 11: CD, CM und MA Probe 12 - 17: CD und CM (bis für jeden Nährboden 10 Proben auswertbar waren)	allen Nährböden
Anlieferungsmilch bei 30°C: Probe 1 - 16 Probe 17 - 68 Probe 69 - 150	10 ⁻³ bis 10 ⁻⁶ 10 ⁻³ bis 10 ⁻⁵ CD, CA, CM, CO: 10 ⁻³ und 10 ⁻⁴ MA: 10 ⁻⁴ und 10 ⁻⁵	CD, CA, CM, CO, MA	MA

Anmerkung: ¹⁾ bei der letzten Auswertung nach 72 h, pro Platte 10 ml 10%ige Essigsäure 10 min lang.

Der Ansatz der Probenverdünnungen erfolgte im Gußplattenverfahren mit jeweils zwei Parallelplatten. Pro Petrischale wurden 17-20 ml Nährboden gegossen. Die in den einzelnen Versuchsabschnitten angesetzten Probenverdünnungen sowie die jeweils verwendeten Nährböden gehen aus Tabelle 14 hervor. Die Platten wurden 72 h bei 30 °C bzw. 37 °C (siehe Tabelle 14) inkubiert.

3.2.1.3.2 Auswertung

Die Auswertung der Milchproben erfolgte nach 24, 48 und 72 h. Es wurden die caseolytisch aktiven Kolonien pro Platte erfaßt. Als solche wurden nur Kolonien gezählt, die einen völlig klaren Hof von mindestens 0,5 mm Breite aufwiesen. Kolonien mit einem klaren Hof von mindestens 1 mm Breite wurden getrennt erfaßt. Erfolgte bei der letzten Auswertung nach 72 h eine Säureüberschichtung (siehe Tabelle 14), wobei pro Platte für 10 min 10 ml 10%ige Essigsäure aufgebracht wurden, so wurden nur diejenigen Kolonien gezählt, die danach noch völlig klare Höfe besaßen. Bei MA wurde diese Säureüberschichtung in jedem Fall durchgeführt, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen (HASTINGS, 1904; HARRIGAN und McCANCE, 1976b; FRANK et al., 1985).

Für die Berechnung des Caseolytengehaltes einer Milchprobe berücksichtigt wurden Platten, wenn sie mindestens 1 positive Kolonie aufwiesen. Nicht ausgewertet wurden Petrischalen, die überwachsen waren oder auf denen sich Aufhellungshöfe derart überschnitten, daß sie nicht mehr gegeneinander abgegrenzt werden konnten. Wenn möglich, wurden zur Berechnung der Caseolytenzahl beide Parallelplatten der niedrigsten auswertbaren und der nächsthöheren Verdünnungsstufe, also insgesamt vier Platten, herangezogen. Die Berechnung des Caseolytengehaltes erfolgte mittels des gewogenen arithmetischen Mittels entsprechend den Vorschriften der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten. Referenzverfahren, L 01.00 - 5 vom November 1983).

3.2.1.4 Identifizierung von Isolaten, die auf MA falsch-positive Ergebnisse erbrachten

Von verschiedenen, bei 30 °C bebrüteten MA-Platten mit Anlieferungsmilchproben wurden vor der Säureüberschichtung 33 Kulturen, bei denen die Art der Aufhellungshöfe auf falsch-positive Ergebnisse hindeutete, isoliert und auf vorgetrocknete MA-Platten ausgestrichen. Als verdächtig wurden Aufhellungshöfe angesehen, wenn sie als klarer Saum eine die Kolonie unmittelbar umgebende Präzipitatzone einfaßten (HASTINGS, 1904; SLOBODSKA-ZAYKOWSKA, 1925; FRAZIER und RUPP, 1928) oder wenn sie - ohne daß ein Präzipitat vorlag - unscharf begrenzt allmählich in das trübe Medium übergingen. Diejenigen Kolo-

nien, deren Aufhellungshöfe in den Milchprobenansätzen nach der Säureüberschichtung klar blieben, wurden verworfen. Die übrigen, die sich nach der Säurebehandlung als negativ bzw. zweifelhaft erwiesen - im letzteren Fall wurden die Höfe durch die Säureüberschichtung etwas trüb, erreichten aber nicht den Trübungsgrad des unveränderten Mediums -, wurden weitergehend untersucht. Als Untersuchungsmaterial dienten die in 24 - 48 h bei 30 °C auf den MA-Platten gewachsenen Kulturen.

Folgende weitergehenden Untersuchungen wurden durchgeführt:

- a) Mikroskopische Beurteilung der Keime im Nativpräparat.
- b) Untersuchung des Gramverhaltens mit dem KOH-Test (GREGERSEN, 1978).
- c) Katalasetest.
- d) Oxidativ/Fermentativ-Test nach HUGH und LEIFSON (1953).
- e) Morphologische Beurteilung im Nativpräparat nach 15stündiger, in einigen Fällen zusätzlich nach 24stündiger Bebrütung in Brain Heart Infusion Broth (Fa. Oxoid CM 225) bei 30 °C, in einigen Fällen in einem weiteren Ansatz auch bei 37 °C.
- f) Prüfung auf Gasbildung während 72stündiger Bebrütung bei 30 °C in Brain Heart Infusion Broth unter Zusatz von 1 % Glucose (Glucose-Monohydrat, Fa. Merck 8342, 1,1 g/100 ml) mit Durham-Röhrchen.
- g) Schließlich wurden auch die Ausstriche auf MA einer 10minütigen Säureüberschichtung mit 10 ml 10%iger Essigsäure unterworfen.

3.2.2 Ergebnisse

3.2.2.1 Caseolytengehalte der Rohmilchproben

Die Ergebnisse der Untersuchung der Vorzugsmilch- und Anlieferungsmilchproben sind in den Tabellen 15, 16 und 17 zusammengefaßt. Es ist dabei der Einfachheit halber von "Caseolytengehalten" die Rede, obwohl man korrekterweise die vor der Säureüberschichtung erhaltenen Werte als "Gehalt der hofbildenden Keime" bezeichnen müßte.

Beim Vergleich der beiden Bebrütungstemperaturen 30 °C bzw. 37 °C mit Vorzugsmilch (Tab. 15) bzw. Anlieferungsmilch (Tab. 16) als Probenmaterial nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde zugleich der Effekt einer Säureüberschich-

Tabelle 15: Caseolytgehalte (Minimalwert $x_{\min}$ / Maximalwert $x_{\max}$ / arithmetisches Mittel $\bar{x}$ / Standardabweichung s / geometrisches Mittel M_g) von jeweils 10 Vorzugsmilchproben¹, ermittelt auf CD, CM und MA nach 72 h bei 30°C bzw. 37°C

Nährboden	Hofbreite	vor/nach Säure- überschicht.	Bebrütungs- temp.	Caseolytgehalte ($\cdot 10^3/\text{ml}$)				
				$x_{\min}$	$x_{\max}$	$\bar{x}$	s	M_g
CD	$\geq 0,5$ mm	vor	30°C	0,42	1,82	1,03	0,47	0,94
			37°C	0,30	2,17	0,90	0,60	0,74
		nach	30°C	0,20	1,73	0,76	0,44	0,65
			37°C	0,30	1,83	0,76	0,55	0,62
	≥ 1 mm	vor	30°C	0,42	1,82	0,89	0,47	0,80
			37°C	0,30	2,08	0,79	0,60	0,64
		nach	30°C	0,20	1,64	0,70	0,42	0,60
			37°C	0,30	1,83	0,70	0,57	0,55
CM	$\geq 0,5$ mm	vor	30°C	0,64	7,50	3,45	2,38	2,59
			37°C	0,20	3,64	1,68	1,18	1,25
		nach	30°C	0,91	10,95	4,05	3,32	2,89
			37°C	0,30	3,00	1,36	1,00	1,04
	≥ 1 mm	vor	30°C	0,64	6,50	3,07	2,09	2,32
			37°C	0,20	3,64	1,55	1,11	1,17
		nach	30°C	0,91	9,05	3,73	2,82	2,71
			37°C	0,30	3,00	1,24	0,87	0,97
MA	$\geq 0,5$ mm	vor	30°C	1,05	14,55	4,23	4,45	2,97
			37°C	0,45	3,81	1,65	1,00	1,40
		nach	30°C	0,91	10,00	3,40	2,83	2,66
			37°C	0,24	3,50	1,24	1,00	0,93
	≥ 1 mm	vor	30°C	0,86	5,45	2,32	1,41	2,00
			37°C	0,41	2,50	1,22	0,68	1,06
		nach	30°C	0,73	5,45	2,24	1,41	1,91
			37°C	0,20	2,50	0,97	0,72	0,75

Anmerkung: ¹⁾ Für den MA wurden nur 9 Proben berücksichtigt. Eine weitere Probe war zwar auswertbar, hätte aber, da sie um zwei Zehnerpotenzen über den anderen lag, die Mittelwerte zu sehr verzerrt.

Tabelle 16: Caseolytgehalte (Minimalwert $x_{\min}$ / Maximalwert $x_{\max}$ / arithmetisches Mittel $\bar{x}$ / Standardabweichung s / geometrisches Mittel M_g) von jeweils 10 Anlieferungsmilchproben¹, ermittelt auf CD, CM und MA nach 72 h bei 30°C bzw. 37°C

Nährboden	Hofbreite	vor/nach Säure- überschicht.	Bebrütungs- temp.	Caseolytgehalte ($\cdot 10^4/\text{ml}$)				
				$x_{\min}$	$x_{\max}$	$\bar{x}$	s	M_g
CD	$\geq 0,5$ mm	vor	30°C	0,75	4,14	2,16	1,04	1,93
			37°C	0,20	1,68	0,76	0,49	0,60
		nach	30°C	0,65	2,59	1,79	0,72	1,63
			37°C	0,15	1,00	0,60	0,33	0,49
	≥ 1 mm	vor	30°C	0,65	3,23	1,80	0,77	1,64
			37°C	0,15	1,05	0,58	0,36	0,46
		nach	30°C	0,55	2,19	1,44	0,54	1,33
			37°C	0,15	0,90	0,48	0,30	0,39
CM	$\geq 0,5$ mm	vor	30°C	0,81	10,48	4,70	3,50	3,60
			37°C	0,25	2,25	0,93	0,56	0,80
		nach	30°C	0,81	10,48	4,70	3,49	3,57
			37°C	0,25	2,25	0,93	0,56	0,80
	≥ 1 mm	vor	30°C	0,67	9,05	3,97	2,95	3,04
			37°C	0,25	2,00	0,82	0,51	0,68
		nach	30°C	0,67	10,00	4,18	3,16	3,15
			37°C	0,25	1,83	0,80	0,47	0,68
MA	$\geq 0,5$ mm	vor	30°C	3,50	30,00	15,20	8,78	12,60
			37°C	6,80	15,50	10,51	2,88	10,18
		nach	30°C	2,00	25,00	11,88	7,66	9,04
			37°C	2,70	13,60	8,44	3,23	7,75
	≥ 1 mm	vor	30°C	3,00	20,00	10,14	5,40	8,79
			37°C	2,00	10,00	5,16	2,25	4,75
		nach	30°C	1,50	20,00	8,09	5,68	6,30
			37°C	1,50	7,30	4,18	1,89	3,73

Anmerkung: ¹⁾ Für den MA wurden nur 8 Proben berücksichtigt. Zwei weitere Proben waren zwar auswertbar, hätten aber, da sie um zwei Zehnerpotenzen über den anderen lagen, die Mittelwerte zu sehr verzerrt.

Tabelle 17: Caseolytgehalte (Minimalwert $x_{\min}$ / Maximalwert $x_{\max}$ / arithmetisches Mittel $\bar{x}$ / Standardabweichung s / geometrisches Mittel M_g) von 150 Anlieferungsmilchproben, ermittelt auf 5 Nährböden nach 48 h und 72 h bei 30°C

Hof- breite	Bebrü- tungs- zeit	Nährboden	Caseolytgehalte ($\cdot 10^4/\text{ml}$)				
			$x_{\min}$	$x_{\max}$	$\bar{x}$	s	M_g^1
$\approx 0,5$ mm	48 h	CD	0,00	11,40	0,81	1,40	1,05
		CA	0,10	27,00	1,58	3,43	1,43
		CM	0,20	21,40	2,29	3,61	1,97
		CO	0,30	31,40	2,32	3,66	2,09
		MA	0,00	236,40	10,25	25,14	5,39
	72 h	CD	0,10	30,00	1,99	4,09	1,65
		CA	0,20	136,40	4,29	13,91	2,44
		CM	0,30	61,90	3,47	6,34	2,71
		CO	0,70	109,50	5,99	11,39	4,18
		MA vor S. ²	1,50	191,70	15,34	26,21	9,79
		MA nach S.	0,00	83,30	6,92	12,33	4,07
≈ 1 mm	48 h	CD	0,00	7,30	0,67	1,05	0,98
		CA	0,10	14,50	1,20	2,02	1,30
		CM	0,20	17,70	1,98	3,01	1,82
		CO	0,30	28,60	2,02	3,32	1,86
		MA	0,00	140,90	5,53	13,43	3,32
	72 h	CD	0,10	18,60	1,58	2,74	1,51
		CA	0,20	72,70	3,02	8,29	2,13
		CM	0,30	57,10	3,14	5,74	2,50
		CO	0,70	109,50	5,13	10,20	3,69
		MA vor S.	1,00	158,30	10,88	20,14	6,89
		MA nach S.	0,00	75,00	5,75	10,48	3,54

Anmerk.: ¹⁾ Zur Berechnung des geometrischen Mittels wurden zu jedem Einzelwert 0,5 Einheiten (d.h. $0,5 \cdot 10^4$) addiert, damit auch die Null-Werte (nunmehr als $0,5 \cdot 10^4/\text{ml}$) berücksichtigt werden konnten.

²⁾ S. = Säureüberschichtung

tung gepüßt. Auf jedem Nährboden wurden zehn Proben untersucht, welche aber nicht für alle Nährböden immer dieselben waren. Vergleiche zwischen den Werten von verschiedenen Nährböden sind deshalb nicht möglich, waren im übrigen aber auch nicht Zweck dieser Versuche. Die Daten einer Zeile in Tabelle 15 bzw. Tabelle 16 stammen von jeweils zehn Proben, abgesehen von MA, bei dem es 9 (Tab. 15) bzw. 8 Proben (Tab. 16) sind. Zur Beurteilung der Streuung der Daten sind in jeder Zeile der Minimalwert ($x_{\min}$) und der Maximalwert ($x_{\max}$) sowie das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (s) aufgeführt. Um nun die bei 30 °C bzw. 37 °C einerseits und vor bzw. nach Säureüberschichtung andererseits erhaltenen Werte sinnvoll miteinander vergleichen zu können, wurde für jede Zeile das geometrische Mittel (M_g) berechnet, denn die Keimzahlen streuten stets um etwa eine Zehnerpotenz. Da beim MA die Ergebnisse von einer (bei Vorzugsmilch) bzw. zwei Proben (bei Anlieferungsmilch) um zwei Zehnerpotenzen über den anderen Werten lagen und damit bei dem vorliegenden Stichprobenumfang auch die geometrischen Mittelwerte zu sehr verzerrt hätten, erschien es zweckmäßig, diese Daten nicht in die Tabellen aufzunehmen, wenngleich die betreffenden Proben prinzipiell auswertbar waren.

Zu vergleichen sind in den Tabellen 15 und 16 - getrennt nach Nährböden und nach den Kategorien "Hofbreite $\geq 0,5$ mm" bzw. " ≥ 1 mm" - zum einen die bei 30 °C erhaltenen Werte mit den bei 37 °C erhaltenen, sowohl vor als auch nach Säureüberschichtung, zum anderen für jede der beiden Temperaturen die vor der Säureüberschichtung ermittelten Werte mit den nach der Säureüberschichtung ermittelten. Es zeigt sich, daß sowohl für die Vorzugsmilch als auch für die Anlieferungsmilch die geometrischen Mittelwerte der Caseolytenzahlen in allen Fällen bei 30 °C höher sind als bei 37 °C, wenn auch die Unterschiede im Falle des CD bei der Vorzugsmilch nur gering ausfallen. Auch die arithmetischen Mittelwerte liegen, abgesehen von zwei gleichen Wertepaaren (Vorzugsmilch, CD), für 30 °C stets über den Werten für 37 °C. Der Effekt der Säureüberschichtung stellt sich dagegen unterschiedlich dar. Während diese Maßnahme bei CD und MA stets eine mehr oder weniger deutliche Senkung des Zählergebnisses zur Folge hatte, sind bei CM im Falle der Vorzugsmilch die Werte danach zum Teil etwas größer, zum Teil etwas kleiner als davor, im Falle der Anlieferungsmilch sind die Keimzahlen bei diesem Nährboden vor und nach der Säureüberschichtung annähernd gleich.

Berücksichtigt man die nach der Säureüberschichtung ermittelten Werte, also die Zahlen der mit Sicherheit "echten" Caseolyten, so bewegte sich - je nach Probe und Nährboden - die Kontamination der Vorzugsmilch mit Caseolyten in der Größenordnung von 10^2 bis 10^4 /ml, die Kontamination der Anlieferungsmilch im Bereich von 10^3 bis 10^5 /ml.

Die Ergebnisse der Untersuchung von 150 Anlieferungsmilchproben bei 30 °C sind in Tabelle 17 zusammengefaßt. Die Werte in einer Zeile stellen für eine bestimmte Hofbreite ($\geq 0,5$ mm bzw. ≥ 1 mm), eine bestimmte Bebrütungszeit (48 h bzw. 72 h) und einen bestimmten Nährboden (CD, CA, CM, CO bzw. MA) die Caseolytgehalte von allen 150 Proben dar - wiederum Minimalwert, Maximalwert, arithmetisches Mittel, Standardabweichung, geometrisches Mittel. Zwar standen zum Zeitpunkt der dritten und letzten Auswertung nach 72 h, vor der Säureüberschichtung des MA, bei allen 150 Proben für alle fünf Nährböden auswertbare Petrischalen zur Verfügung, doch wies in einigen Fällen bei der Auswertung nach 48 h bzw. nach der Säureüberschichtung des MA keine der Platten des CD bzw. MA eine hofbildende Kolonie bzw. eine Kolonie mit einem Hof ≥ 1 mm auf. Diese Ansätze wurden als Null-Werte in die statistischen Berechnungen einbezogen. Zur Ermittlung der geometrischen Mittelwerte wurden zu jedem Einzelwert 0,5 Einheiten (d.h. $0,5 \cdot 10^4$) addiert, damit auch die Null-Werte (nunmehr als $0,5 \cdot 10^4$ /ml) berücksichtigt werden konnten, während die Unterschiede zwischen den Einzelwerten gewahrt blieben.

Die geometrischen Mittelwerte nehmen für die Auswertung nach 48 h sowohl für die Kategorie der Kolonien mit Aufhellungshöfen $\geq 0,5$ mm als auch für die Kategorie mit Höfen ≥ 1 mm in derselben Reihenfolge MA > CO > CM > CA > CD ab, wobei beidemale die Unterschiede zwischen CO und CM geringfügig, ansonsten aber deutlich und statistisch hoch signifikant (t-Test) sind. Für die letzte Auswertung nach 72 h ergibt sich wiederum für beide genannten Kategorien prinzipiell dieselbe abnehmende Reihenfolge der geometrischen Mittelwerte, wobei sich aber noch ein zusätzlicher Wert "MA nach Säureüberschichtung" dazwischenschiebt:

MA vor Säureüberschichtung > CO > MA nach Säureüberschichtung > CM > CA > CD. Auch hier sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Nährböden deutlich und statistisch signifikant, abgesehen von der in beiden Fällen geringfügigen Differenz zwischen den Werten für MA nach Säureüberschichtung und CO.

Von der zweiten zur dritten Auswertung, also zwischen den Zeitpunkten 48 h und 72 h, erhöhten sich die Zählergebnisse etwa um den Faktor 1,4 bei CM bis 2 bei CO und MA. Bei der ausschließlich beim MA durchgeführten Säureüberschichtung erwiesen sich im Falle der Kategorie " $\geq 0,5$ mm" fast drei Fünftel, im Falle der Kategorie " ≥ 1 mm" nahezu die Hälfte der hobbildenden Kolonien als falsch-positiv.

Läßt man die Null-Werte außer acht, so lag die Kontamination der untersuchten Anlieferungsmilchproben mit "echten" Caseolyten je nach Nährboden für die Auswertung nach 48 h im Bereich von 10^3 bis 10^5 pro ml, für die Auswertung nach 72 h in der Größenordnung von 10^3 bis 10^6 pro ml.

3.2.2.2 Identifizierung von Isolaten, die auf MA falsch-positive Ergebnisse erbrachten

Von den 33 auf MA als verdächtig eingestuften Kolonien erwiesen sich nach der Säureüberschichtung der Gußplatten 3 als positiv, 16 als negativ und 14 als zweifelhaft. Die 30 negativen bzw. zweifelhaften Kulturen wurden weitergehend untersucht. Eine dieser Kulturen wuchs auf MA nicht. Bei zweien blieben die Aufhellungshöfe der Verdünnungsausstriche auf MA bei der abschließenden Säureüberschichtung klar. Sie wurden deshalb als "echte" Caseolyten betrachtet.

Von den verbleibenden 27 Isolaten waren 24 grampositive, Katalase-negative kokkoide Stäbchen bzw. Kokken, von denen 23 aufgrund weitergehender Untersuchungen den Gattungen Streptococcus bzw. Enterococcus zugeordnet werden konnten (zur Gattung Enterococcus siehe COLLINS et al., 1984, und SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ, 1984). Bei der Säureüberschichtung des Verdünnungsausstrichs auf MA erwiesen sich von diesen 23 Kulturen 18 als negativ, 5 als zweifelhaft.

Eine weitere Kultur konnte der Gattung Lactobacillus zugeordnet werden, zwei Kulturen waren nicht identifizierbar.

3.3 Vergleich der Produktivität verschiedener Nährböden bei der Zählung von Caseolyten in Milchtrockenprodukten

3.3.1 Material und Methodik

3.3.1.1 Probenmaterial

Zur Untersuchung gelangten 84 Milchtrockenprodukte (zu denen im folgenden auch Fertigbreie mit Frucht- oder Getreidezusatz gezählt werden) für Säuglinge und Kleinkinder, die, da sie "unter Verwendung von Milch, Milcherzeugnissen oder Milchbestandteilen hergestellt" sind, den Bestimmungen des § 14 Abs. 2 Nr. 4 der Verordnung über diätetische Lebensmittel vom 20. Juni 1963 in der Fassung vom 21. Januar 1982 unterliegen und damit auch auf ihren Gehalt an "aeroben sporenbildenden oder anderen eiweißlösenden Bakterien (Kaseolyten)" zu untersuchen sind. Es handelte sich um 62 Proben von Säuglings-, Kleinkinder- und Heilnahrung auf Trockenmilchbasis sowie 22 Proben von Fertigbreien mit Frucht- oder Getreidezusatz von zwei verschiedenen Herstellern. Enthielt eine Packung mehrere Innenbeutel, so wurden diese als verschiedene Proben gezählt.

3.3.1.2 Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Nährböden

Verwendet wurden CD, CA, CM, CO und MA, wie im Abschnitt 3.1.1.1 (Seite 49) beschrieben.

3.3.1.3 Untersuchung der Milchtrockenprodukte

3.3.1.3.1 Vorbereitung, Ansatz und Bebrütung

Die Vorbereitung der Proben erfolgte gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (Vorbereitung der Proben für mikrobiologische Untersuchungen. Verfahren für Trockenmilcherzeugnisse, L 02.07 - 1 vom September 1980). Die Ausgangsverdünnungen wurden zur Erzielung einer besseren Keimverteilung aus 50 g Pulver + 450 ml Ringerlösung hergestellt. Angesetzt wurden bei der ersten Hälfte der Proben die Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} , bei der zweiten Hälfte allein die Verdünnung 10^{-2} . Es wurde im Gußplattenverfahren mit jeweils vier Parallelplatten, zwei für die Bebrütung bei 30 °C und zwei bei 37 °C, gearbeitet. Die pro Petri-

schale gegossene Nährbodenmenge betrug 17 - 20 ml.

Alle Proben wurden 72 h bei 30 °C und 37 °C inkubiert.

3.3.1.3.2 Auswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte nach 24, 48 und 72 h, wie im Abschnitt 3.2.1.3.2 (Seite 64) für die Rohmilchproben beschrieben, allerdings wurde bei der letzten Auswertung nach 72 h bei den Platten aller Nährböden stets eine Säureüberschichtung durchgeführt.

3.3.1.4 Differenzierung von aus Milchtrockenprodukten isolierten Caseolyten

Von verschiedenen, bei 30 °C bzw. 37 °C bebrüteten Platten aller fünf verwendeten Nährböden mit Probenverdünnungen verschiedener Milchtrockenprodukte wurden vor der Säureüberschichtung positive Kolonien nach dem Zufallsprinzip isoliert und auf vorgetrockneten MA-Platten ausgestrichen. Diejenigen Isolate, deren Aufhellungshöfe in den Probenansätzen nach der Säureüberschichtung nicht klar blieben, wurden verworfen. Mit den verbleibenden 180 Isolaten wurden die folgenden orientierenden Untersuchungen durchgeführt, wobei als Material die in 24 - 48 h bei 30 °C auf den MA-Platten gewachsenen Ausstrichkulturen dienten:

- a) Mikroskopische Beurteilung der Keime im Nativpräparat; dabei wurde besonders auf Versporung geachtet.
- b) Untersuchung des Gramverhaltens mit dem KOH-Test (GREGERSEN, 1978).
- c) Katalasetest.

3.3.2 Ergebnisse

3.3.2.1 Ermittelte Caseolytengehalte der Milchtrockenprodukte

Von den insgesamt 84 untersuchten Milchtrockenprodukten erwiesen sich acht als nahezu keimfrei. Die Ergebnisse der übrigen 76 Einzelproben sind in Tabelle 18 zusammengefaßt.

Der Einfachheit halber ist dabei von "Caseolytengehalten" die Rede, obwohl man korrekterweise die vor der Säureüberschichtung erhaltenen Werte als "Gehalt der hofbildenden Keime" bezeichnen müßte. Ebenfalls der Einfachheit hal-

Tabelle 18: Caseolytengehalte (Höfe $\geq 0,5$ mm) (Minimalwert $x_{\min}$ / Maximalwert $x_{\max}$ / arithmetisches Mittel $\bar{x}$ / Standardabweichung s / geometrisches Mittel M_g) von 76 Proben von Milchtrockenprodukten, ermittelt auf 5 Nährböden nach 48 h und 72 h bei 30°C bzw. 37°C

Bebrütungszeit	Bebrütungs-temp.	Nährboden	Caseolyten/g				
			$x_{\min}$ (in Klammern: Zahl d. Null-Werte)	$x_{\max}$	$\bar{x}$	s	M_g^1
48 h	30°C	CD	0 (30)	300	58	85	9
		CA	0 (9)	600	98	107	42
		CM	0 (6)	1 050	234	196	115
		CO	0 (8)	1 250	208	212	80
		MA	0 (12)	1 000	207	207	65
	37°C	CD	0 (24)	450	65	88	13
		CA	0 (5)	650	134	128	66
		CM	0 (5)	700	191	147	95
		CO	0 (3)	550	206	149	114
		MA	0 (2)	600	187	134	118
72 h (vor Säure- übersch.)	30°C	CD	0 (11)	650	117	127	41
		CA	0 (3)	1 000	173	171	95
		CM	0 (5)	1 550	303	267	149
		CO	0 (2)	1 150	246	213	137
		MA	0 (2)	1 500	329	314	175
	37°C	CD	0 (7)	600	113	118	53
		CA	0 (1)	850	201	178	120
		CM	0 (5)	1 250	268	219	129
		CO	0 (2)	1 150	273	205	166
		MA	0 (3)	800	255	189	149
72 h (nach Säure- übersch.)	30°C	CD	0 (21)	600	77	104	18
		CA	0 (3)	1 000	172	184	91
		CM	0 (1)	1 500	298	259	184
		CO	0 (5)	1 200	230	220	108
		MA	0 (3)	1 000	223	187	123
	37°C	CD	0 (17)	550	91	112	24
		CA	0 (1)	750	197	171	117
		CM	0 (2)	1 100	270	204	158
		CO	0 (4)	1 000	235	190	125
		MA	0 (4)	500	189	138	110

Anmerkung: ¹⁾ Zur Berechnung des geometrischen Mittels wurden zu jedem Einzelwert 0,5 Einheiten addiert, damit auch die Null-Werte (nunmehr als 0,5/g) berücksichtigt werden konnten.

ber wurde auf eine gesonderte Zusammenstellung der Werte für Kolonien mit Höfen ≥ 1 mm verzichtet; die Ergebnisse beschränken sich auf die Zahlen der Kolonien mit Höfen $\geq 0,5$ mm.

Die Daten sind entsprechend den Ergebnissen der Untersuchung der Rohmilchproben aufgeführt. Somit stellen die Werte in einer Zeile für eine bestimmte Bebrütungszeit (48 h, 72 h vor Säureüberschichtung bzw. 72 h nach Säureüberschichtung), eine bestimmte Bebrütungstemperatur (30 °C bzw. 37 °C) und einen bestimmten Nährboden (CD, CA, CM, CO bzw. MA) die CaseolytENZahlen von allen 76 Einzelproben dar - auch hier wiederum Minimalwert ($x_{\min}$) und Maximalwert ($x_{\max}$) sowie arithmetisches Mittel ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) zur Beurteilung der Verteilung der Einzelwerte, geometrisches Mittel (M_g) als zweckmäßiger Mittelwert der um zwei Zehnerpotenzen (wenn man Null-Werte nicht berücksichtigt) streuenden Einzelwerte.

Bei zahlreichen Proben wiesen alle Petrischalen eines oder zweier Nährböden keinerlei hofbildende Kolonien auf, während auf den Platten der anderen Medien mit denselben Proben mehrere zählbar waren. Derartige negative Ansätze wurden - wie bei den Rohmilchproben - als Null-Werte in die statistischen Berechnungen einbezogen. Zur Ermittlung der geometrischen Mittelwerte wurden hier ebenfalls zu jedem Einzelwert 0,5 Einheiten addiert, damit auch die Null-Werte (nunmehr als 0,5/g) berücksichtigt werden konnten, während die Unterschiede zwischen den Einzelwerten prinzipiell gewahrt blieben. Da solche Null-Werte insbesondere bei CD häufig vorkamen und damit vor allem bei diesem Nährboden die geometrischen wie die arithmetischen Mittelwerte erheblich beeinflussten, ist ihre Anzahl in der Spalte " $x_{\min}$ " vermerkt.

Vergleicht man die geometrischen Mittelwerte hinsichtlich des Einflusses der Bebrütungstemperatur, so zeigt sich, daß für die Auswertung nach 48 h bei CD, CA, CO und MA bei 37 °C eine höhere Ausbeute erzielt wurde, bei CM dagegen bei 30 °C. Für die Auswertung nach 72 h, nach Säureüberschichtung, war das Ergebnis bei CD, CA und CO bei 37 °C besser, bei CM und MA hingegen bei 30 °C. Der Einfluß der Säureüberschichtung war für die verschiedenen Nährböden ebenfalls nicht einheitlich, aber bei jedem Medium für beide Bebrütungstemperaturen gleich. Während die Überschichtung bei CD, CO und MA eine deutliche, bei CA eine nur sehr geringfügige Reduktion des Zählergebnisses zur Folge hatte, waren im Fall des CM die Zahlen nach der Säurebehandlung höher.

Im Vergleich der einzelnen Nährböden untereinander schnitt der CD stets am schlechtesten ab. Die "Rangfolge" der übrigen Nährböden ist unterschiedlich und stellt sich für die vier diesbezüglich relevanten Fälle folgendermaßen dar:

Nach 48 h bei 30 °C: CM > CO > MA > CA > CD.

Nach 48 h bei 37 °C: MA > CO > CM > CA > CD.

Nach 72 h bei 30 °C, nach Säureüberschichtung: CM > MA > CO > CA > CD.

Nach 72 h bei 37 °C, nach Säureüberschichtung: CM > CO > CA > MA > CD.

Von der zweiten zur dritten Auswertung, also zwischen den Zeitpunkten 48 h und 72 h (vor Säureüberschichtung), erhöhten sich die Werte für die Bebrütungstemperatur 30 °C um den Faktor 1,3 bei CM bis 4,6 bei CD, für die Bebrütungstemperatur 37 °C um den Faktor 1,3 bei MA bis 4,1 bei CD.

Die nach 72 h ermittelten tatsächlichen, d.h. nach Säureüberschichtung erhaltenen Caseolytenzahlen der 76 Einzelproben lagen, je nach Probe, Nährboden und Bebrütungstemperatur, im Bereich zwischen 0 und 1 500/g Pulver. Der Grenzwert der Diät-Verordnung von "in 0,1 Gramm des trocken oder eingedickt in den Verkehr gebrachten Lebensmittels nicht mehr als 150" Caseolyten, d.h. maximal 1 500/g Pulver, wurde lediglich von einer Probe auf einem einzigen Nährboden bei einer der beiden Bebrütungstemperaturen erreicht (CM, 30 °C) und von keiner Probe überschritten. Ohne Säureüberschichtung hätte der entsprechende Wert für die genannte Probe 1 550 Caseolyten/g betragen.

3.3.2.2 Differenzierung von aus Milchtrockenprodukten isolierten Caseolyten

Von den 180 aus Milchtrockenprodukten isolierten Caseolyten waren 177 auf den MA-Ausstrichplatten gewachsen. Vier dieser Kulturen waren gramnegativ, 173 grampositiv. Diese 173 grampositiven Isolate unterteilen sich in:

- a) 64 Sporenbildner: 63 dieser Kulturen mit Sporenbildung waren Katalase-positive, kurze bis schlanke Stäbchen, es dürfte sich somit um *Bacillus* species handeln. 1 Kultur bestand aus Katalase-negativen, schlanken Stäbchen.
- b) 49 Katalase-positive, kurze bis schlanke Stäbchen ohne nachweisbare Sporenbildung.
- c) 60 Katalase-positive, kokkoide Stäbchen bzw. Kokken ohne nachweisbare Sporenbildung.

4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Lange Zeit wurden Bazillen und anderen Proteolyten pathogene Eigenschaften aufgrund der Freisetzung toxischer Eiweißabbauprodukte (SCHÖNBERG, 1949; ROEMMELE, 1957; SCHÖNBERG und KÖNEKAMP, 1962), zum Teil in Verbindung mit der Produktion spezifischer Bakterientoxine (SCHÖNBERG, 1949), zugeschrieben. In Anbetracht der Tatsache, daß sich vor allem Bazillen in aus Milchpulver rekonstituierter Milch unter Ausschluß einer antagonistischen Flora stark vermehren können (MENNINGER, 1957), kam es ab dem Ende der fünfziger Jahre zu Bestrebungen, für Milchtrockenprodukte, die für die besonders gefährdete Verbrauchergruppe der Säuglinge und Kleinkinder bestimmt sind, Grenzwerte bezüglich des Gehalts an aeroben Sporenbildnern und "sonstigen Kaseolyten" festzusetzen (ROEMMELE und WESTPHAL, 1957; BULLING, 1959). Diese Vorstellungen fanden Eingang in die Verordnung über diätetische Lebensmittel vom 20. Juni 1963, welche in der Fassung vom 21. Januar 1982 in § 14 Abs. 2 Nr. 4c vorschreibt, daß diätetische Lebensmittel für Säuglinge oder Kleinkinder, sofern sie unter Verwendung von Milch, Milcherzeugnissen oder Milchbestandteilen hergestellt sind, unter anderem die Anforderung erfüllen müssen, daß "in 1,0 Milliliter des genußfertig oder in 0,1 Gramm des trocken oder eingedickt in den Verkehr gebrachten Lebensmittels nicht mehr als 150 aerobe sporenbildende oder andere eiweißlösende Bakterien (Kaseolyten) züchtbar sein" dürfen. Zur Zählung der Caseolyten ist nach Anlage 5 der Diät-Verordnung ein "Calcium-Kaseinat-Agar" zu verwenden, welcher erstmals vom INSTITUT F. TIERÄRZTL. LEBENSMITTELKUNDE UND MILCHHYGIENE DER TIERÄRZTL. HOCHSCHULE HANNOVER (1958) zum Nachweis von Caseolyten in Milch beschrieben und von SCHÖNBERG und KRAUS (1958) zur Zählung von Caseolyten in Vorzugsmilch empfohlen wurde. Die aufwendige Herstellung dieses von KRAUS (1960a) als "Calcium-Caseinpeptonagar", im Rahmen der vorliegenden Arbeit kurz als CD bezeichneten Nährbodens ist aus der Arbeitsvorschrift nach Anlage 5 der Diät-Verordnung zu ersehen (siehe Abschnitt 3.1.1.1, Seite 49). Der Frage, ob der nach der Diät-Verordnung für den Caseolyten-Nachweis angegebene Nährboden durch ein vergleichbares Fabrikat des Handels ersetzt werden könnte, ist im Rahmen eines Ringversuchs schon einmal nachgegangen worden (MEYER, 1975). In der vorliegenden Arbeit sollten im Hinblick auf eine zu erwartende Änderung der Diät-Verordnung ein einfach herzustellender 10%iger Magermilchagar (mit MA abgekürzt), zwei Fertignährböden

("Calcium-Caseinat-Agar nach FRAZIER a. RUPP (1928), modifiziert von BRANDT (1939)" der Firma Merck, mit CM abgekürzt, und "Calcium-Caseinat-Agar nach FRAZIER und RUPP, modifiziert" der Firma Oxoid, mit CO abgekürzt) sowie eine Modifikation des vorgeschriebenen Mediums, bei der die Caseinatlösung (Lösung 1) autoklaviert wurde (mit CA abgekürzt) hinsichtlich ihrer Produktivität bei der Zählung von Caseolyten in Rohmilch und in Milchtrockenprodukten mit dem Originalnährboden verglichen werden, um zu prüfen, ob sich eines oder mehrere dieser Medien als zumindest gleichwertig und damit für eine Vereinfachung des Caseolytennachweises geeignet erweisen würden. Außerdem wurden Untersuchungen zur Elektivität der genannten und anderer, zum Nachweis von Proteolyten beschriebener Nährböden durchgeführt.

4.1 Produktivität der Nährböden bei der Zählung von Caseolyten in Rohmilch

4.1.1 Einfluß der Bebrütungstemperatur

Um die unterschiedlichen Nährböden im Hinblick auf ihre Eignung zur Zählung von Caseolyten aus einer möglichst heterogenen Flora zu vergleichen, wurde zunächst Rohmilch als Untersuchungsmaterial gewählt, da in diesem Material relativ hohe Zahlen und eine große Vielfalt an proteolytischen Bakterien zu erwarten sind (siehe Abschnitt 2.4.1.1, Seite 31). Hinsichtlich der Frage der geeigneten Inkubationsbedingungen erschien es dabei sinnvoll, den Einfluß verschiedener Bebrütungstemperaturen (30 °C bzw. 37 °C) zu vergleichen. Eine Inkubationstemperatur von 30 °C ist zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Milch gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten. Referenzverfahren, L 01.00 - 5 vom November 1983) vorgeschrieben und wurde von einigen Autoren zur Zählung von Caseolyten in Milch (ZAADHOF und TERPLAN, 1967; MARTLEY et al., 1970) oder Butter (DRUCE und THOMAS, 1959) gewählt. Eine Temperatur von 37 °C empfehlen SCHÖNBERG und KRAUS (1958) - neben 20 °C - für die Zählung von Caseolyten in Vorzugsmilch. Sie ist außerdem in Anlage 5 der Diät-Verordnung für die Bestimmung des Caseolytengehalts von Milchtrockenprodukten für Kleinkinder und Säuglinge vorgesehen. Die Bebrütungszeit wurde beim Vergleich der beiden Inkubationstemperaturen - wie in allen folgenden Versuchen - mit 72 h festgesetzt, ebenfalls in Anlehnung an die Bestimmung der Gesamtkeimzahl in

Milch sowie gemäß einer Empfehlung von MEYER (1975) für die Untersuchung von Säuglingsnahrung auf Caseolyten.

Die Untersuchung von jeweils 10 Vorzugsmilchproben auf CD, CM und MA bei 30 °C und 37 °C erbrachte, wenn die geometrischen Mittelwerte verglichen werden (Tabelle 15, Seite 66), für alle drei Nährböden in allen Fällen (Höfe $\geq 0,5$ mm bzw. ≥ 1 mm; vor bzw. nach Säureüberschichtung) höhere Zahlen bei der tieferen Temperatur. Jedoch erwiesen sich diese - im Falle des CD nur geringen - Unterschiede bei einer Überprüfung mittels des t-Tests in lediglich drei Fällen als statistisch schwach signifikant (Überschreitungswahrscheinlichkeit $p < 0,05$). Da die Vorzugsmilchproben alle aus demselben Erzeugerbetrieb stammten und damit die Möglichkeit bestand, daß das erhaltene Ergebnis für eine in etwa gleichbleibende "Hausflora" dieses Betriebes spezifisch war, wurden die Untersuchungen mit Molkereianlieferungsmilch wiederholt, wodurch sichergestellt war, daß Rohmilch aus zahlreichen verschiedenen Beständen zur Untersuchung gelangte. Auch hier waren in allen Fällen die geometrischen Mittelwerte der Zahlen der hofbildenden Kolonien bei 30 °C größer als bei 37 °C (Tabelle 16, Seite 67), wobei sich die Keimzahlen bei CD und CM um den Faktor 3 bis 5 unterschieden. Der t-Test zeigte für die Unterschiede bei CD und CM in allen Fällen eine hohe Signifikanz auf ($p < 0,001$), während im Falle des MA lediglich ein Unterschied sich statistisch absichern ließ ($p < 0,05$). Insgesamt gesehen scheint also für die Untersuchung von Rohmilch auf Caseolyten eine Inkubationstemperatur von 30 °C geeigneter zu sein als eine Temperatur von 37 °C. Deshalb wurde im weiteren bei der Untersuchung von 150 Anlieferungsmilchproben nur noch bei 30 °C bebrütet. Ein besseres Wachstum der Mehrzahl der proteolytischen Bakterien der Rohmilch bei der tieferen Temperatur ist angesichts des Umstandes, daß es sich dabei um ein gekühltes Produkt handelt, zu erwarten. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang jedoch, daß das Temperaturoptimum der meisten bakteriellen Proteinasen um 40 °C oder höher liegt (siehe Tabelle 2, Seite 10), also eindeutig näher bei 37 °C als bei 30 °C. Entscheidend ist also offensichtlich das bessere Keimwachstum, wobei die tiefere Bebrütungstemperatur für die Ausbildung deutlicher Höfe zumindest ausreichend ist.

4.1.2 Einfluß der Bebrütungszeit

An einen Test, der praxisnah sein soll, ist unter anderem die Anforderung nach rascher Auswertbarkeit zu stellen. In diesem Sinne wäre es günstig, wenn auch die Untersuchung von Rohmilch auf Caseolyten bereits nach 48 h brauchbare Resultate liefern würde. Dazu wurden die bei der Untersuchung von 150 Anlieferungsmilchproben bei 30 °C (siehe Tabelle 17, Seite 68) nach 48 h erhaltenen Ergebnisse mit den nach 72 h ermittelten Werten verglichen (Tabelle 19). Eine Berücksichtigung der 24 h-Werte kam nicht in Betracht, da zu diesem Zeitpunkt in den meisten Fällen noch gar keine oder erst sehr wenige Kolonien mit Aufhellungshöfen zählbar waren. Wie aus Tabelle 19 hervorgeht, erhöhten sich die Keimzahlen zwischen der zweiten Auswertung nach 48 h und der dritten Auswertung nach 72 h etwa um den Faktor 1,4 bei CM bis 2,0 bei CO und MA. Zu einer wesentlichen Zunahme kam es jedoch in diesem Zeitraum nicht mehr. Je nach Nährboden und Hof-Kategorie wurden bereits nach 48 h ungefähr bzw. genau die Hälfte (MA bzw. CO) bis fast drei Viertel (CM) der nach 72 h schließlich gezählten hofbildenden Kolonien erfaßt. Darüber hinaus besteht in allen Fällen eine enge Korrelation zwischen den 48 h-Werten und den 72 h-Werten, wie die Korrelationskoeffizienten zwischen 0,78 und 0,95 (stets $p < 0,001$) zeigen. Diese Ergebnisse lassen es somit gerechtfertigt erscheinen, die Ansätze für die Zählung von Caseolyten in Rohmilch schon nach 48 h abschließend auszuwerten, einer Bebrütungszeit, die auch ZAADHOF und TERPLAN (1967) bei der Ermittlung des Caseolytengehalts von Milch für ausreichend erachteten und die in der 15. Auflage der "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (FRANK et al., 1985) für die Untersuchung von roher oder erhitzter Milch auf Caseolyten als untere Grenze angegeben wird (48–72 h bei 32 °C). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß zwar sowohl nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten. Referenzverfahren, L 01.00 – 5 vom November 1983) als auch nach DIN (Mikrobiologische Milchuntersuchung. Bestimmung der Keimzahl. Referenzverfahren, DIN 10 192, Teil 1 vom April 1984) die Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Milch und Milchprodukten noch über eine 72stündige Bebrütung durchgeführt wird. Es wird jedoch diskutiert, diese 72 h nur noch für bestimmte Produkte (pasteurisierte Milch, Milchtrockenprodukte) beizubehalten und ansonsten generell 48 h als Bebrütungszeit vorzuschreiben.

Tabelle 19: Korrelation der nach 48 h und der nach 72 h erhaltenen Caseolytengehalte von 150 Anlieferungsmilchproben (r = Korrelationskoeffizient; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit)

Hofbreite	Nährboden	Caseolytengehalte ($\cdot 10^4/\text{ml}$) (geometr. Mittel von 150 Proben)		Zunahme zwisch. 48 und 72 h (Faktor)	Anteil des 48 h-Werts am 72 h-Wert	r	p
		48 h	72 h				
IV 0,5 mm	CD	1,05	1,65	1,6	64%	0,90	< 0,001
	CA	1,43	2,44	1,7	59%	0,91	< 0,001
	CM	1,97	2,71	1,4	73%	0,86	< 0,001
	CO	2,09	4,18	2,0	50%	0,91	< 0,001
	MA	5,39	9,79	1,8	55%	0,95	< 0,001
IV 1 mm	CD	0,98	1,51	1,5	65%	0,88	< 0,001
	CA	1,30	2,13	1,6	61%	0,78	< 0,001
	CM	1,82	2,50	1,4	73%	0,85	< 0,001
	CO	1,86	3,69	2,0	50%	0,91	< 0,001
	MA vor Säureübersch.	3,32	6,89	2,1	48%	0,90	< 0,001

Für CO, den Caseinatnährboden, der sowohl nach 48 h als auch nach 72 h die höchste Produktivität aufwies (siehe unten), würde eine Auswertung nach 48 h bedeuten, daß damit etwa die Hälfte der nach 72 h theoretisch zählbaren Caseolyten einer Rohmilchprobe zu registrieren wäre.

4.1.3 Vergleich der Ergebnisse von den verschiedenen Nährböden untereinander

Die Ergebnisse der Untersuchung von 150 Anlieferungsmilchproben bei 30 °C (Tabelle 17, Seite 68) bilden für die Auswertung nach 48 h sowohl für die Kategorie der Kolonien mit Aufhellungshöfen $\geq 0,5$ mm als auch für die Kategorie mit Höfen ≥ 1 mm die nachstehende abnehmende Reihenfolge der geometrischen Mittelwerte der Keimzahlen (in Klammern hinter dem Nährboden das geometrische Mittel $\cdot 10^4/\text{ml}$):

Höfe $\geq 0,5$ mm: MA (5,39) > CO (2,09) > CM (1,97) > CA (1,43) > CD (1,05)

Höfe ≥ 1 mm: MA (3,32) > CO (1,86) > CM (1,82) > CA (1,30) > CD (0,98)

Bei beiden Kategorien erwiesen sich alle Unterschiede zwischen den einzelnen Nährböden im t-Test als hoch signifikant ($p < 0,001$), mit Ausnahme der beidermal geringfügigen Abweichung zwischen CO und CM, die im Falle der Kategorie " $\geq 0,5$ mm" mit $p < 0,05$ nur schwach signifikant ist, während im Falle der Kategorie " ≥ 1 mm" keine Signifikanz besteht ($p > 0,05$). Auch die geometrischen Mittelwerte der bei der letzten Auswertung der gleichen 150 Anlieferungsmilchproben nach 72 h erhaltenen Ergebnisse stellen sich für die Kategorie der Kolonien mit Aufhellungshöfen $\geq 0,5$ mm in derselben Reihenfolge dar wie für die Kategorie " ≥ 1 mm" (in Klammern wiederum das geometrische Mittel $\cdot 10^4/\text{ml}$):

Höfe $\geq 0,5$ mm: MA vor Säureüberschichtung (9,79) > CO (4,18)
> MA nach Säureüberschichtung (4,07) > CM (2,71)
> CA (2,44) > CD (1,65)

Höfe ≥ 1 mm: MA vor Säureüberschichtung (6,89) > CO (3,69)
> MA nach Säureüberschichtung (3,54) > CM (2,50)
> CA (2,13) > CD (1,51)

Auch nahezu alle Unterschiede zwischen diesen nach 72 h erhaltenen Werten stellten sich bei einer Überprüfung im t-Test für beide Kategorien als hoch signifikant ($p < 0,001$) dar. Ausnahmen bilden lediglich die Abweichung zwischen CA und CM für die Kategorie " $\geq 0,5$ mm", welche mit $p < 0,01$ signifikant ist, und die Differenz zwischen CO und MA nach Säureüberschichtung, die sich nicht als signifikant erwies ($p > 0,05$).

Die hohe Überlegenheit des MA bei den 48 h-Werten ist selbstverständlich darauf zurückzuführen, daß zu diesem Zeitpunkt keine Säureüberschichtung durchgeführt werden konnte, weil die Platten ja noch weiterbebrütet werden sollten. Berücksichtigt man, daß sich durch die Säureüberschichtung nach 72 h von den hofbildenden Kolonien auf MA im Falle der Kategorie " $\geq 0,5$ mm" fast drei Fünftel, im Falle der Kategorie " ≥ 1 mm" nahezu die Hälfte als falsch-positiv erwiesen haben, und unterstellt man diese Verhältnisse auch für die Zeit nach 48 h, so errechnen sich für diesen Zeitpunkt bei MA Caseolytenzahlen in der Größenordnung der mit CO und CM erhaltenen Werte. Hervorzuheben ist die eindeutige Unterlegenheit des CD. Vergleicht man die 48 h-Werte - wobei die Ergebnisse von MA natürlich nicht einbezogen werden können -, so liegen die mit den anderen Nährböden ermittelten Caseolytenzahlen um etwa den Faktor 1,3 (bei CA) bis 2 (bei CO) über den mit CD erhaltenen Resultaten. Im Vergleich der 72 h-Werte (ohne MA vor Säureüberschichtung) sind die Caseolytenzahlen bei den anderen Nährböden um etwa den Faktor 1,5 (bei CA) bis 2,5 (bei CO) höher als bei CD. Dabei dürfte die im Vergleich zu CD höhere Ausbeute bei CA auf die durch das Autoklavieren der Lösung 1 bedingte stärkere Hitzedenaturierung des Caseins des CA zurückzuführen sein. So kommt es nach RENNER (1982) im Laufe der Erhitzung zu einer Auflockerung der Struktur der Milchproteine, wodurch das Eiweiß zumindest von einigen Enzymen leichter angegriffen werden kann.

Zusammenfassend ließ sich also nachweisen, daß bei der Zählung von Caseolyten in Rohmilch ohne großen Arbeitsaufwand herzustellende Nährböden (CM, CO, MA) hinsichtlich ihrer Produktivität dem CD deutlich überlegen sind. Ähnliche Beobachtungen machten mit einem anderen als in der vorliegenden Arbeit verwendeten Milchagar (Milchagar nach BAIRD-PARKER, 1963) bereits ZAADHOF und TERPLAN (1967), die eine signifikante Unterlegenheit des CD bei der Zählung von Caseolyten in roher und pasteurisierter Trinkmilch feststellten.

Hinsichtlich des Anteils der Kolonien, die größere, d.h. gemessen vom Kolonierand mindestens 1 mm breite Aufhellungshöfe ausgebildet haben, sind, was die Zahlen der Caseolyten betrifft, keine auffälligen Unterschiede zwischen den verschiedenen Nährböden erkennbar. Caseolytische Kolonien mit einem Hof ≥ 1 mm machen sowohl nach 48 h als auch nach 72 h rund 90 % (87 - 93%) der caseolytischen Kolonien mit einem Hof $\geq 0,5$ mm aus. Beim nicht säureüberschichteten MA ist der entsprechende Anteil mit 62 % nach 48 h bzw. 70 % nach

72 h allerdings deutlich geringer. Angesichts der Tatsache, daß ca. 90 % der caseolytischen Kolonien Aufhellungshöfe von mindestens 1 mm Breite besaßen, wäre bei der Zählung von Caseolyten in Rohmilch eine Beschränkung auf diese Kolonien wohl vertretbar. Insbesondere im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Untersucher könnte man dadurch Schwierigkeiten, die mit der raschen Bewertung schmalerer Höfe verbunden sind, vermeiden. Grundsätzlich ist es, um subjektive Einflüsse soweit als möglich auszuschalten, ratsam, nur Kolonien zu zählen, deren Aufhellungshöfe zum einen völlig klar sind, was voraussetzt, daß sie in der gesamten Nährbodenschicht ausgebildet sind, und zum anderen eine definierte Mindestbreite aufweisen. Letzteres Kriterium wird in der Regel nur vage formuliert, indem gefordert wird, ausschließlich Kolonien mit "gut erkennbaren", "deutlich erkennbaren", "mit dem freien Auge erkennbaren" Aufhellungshöfen zu zählen (MEYER, 1975; FORSCHNER, 1976; Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- u. Forschungsanstalten: Bestimmung von Eiweißzersettern (Proteolyten), Verfahren mit Calcium-Caseinat-Agar (für Caseolyten), M 7.3.2 vom Januar 1985).

4.2 Produktivität der Nährböden bei der Zählung von Caseolyten in Milch-trockenprodukten

4.2.1 Einfluß der Bebrütungstemperatur

Für den Vergleich der Produktivität der Nährböden bei der Zählung von Caseolyten in Milchtrockenprodukten standen von zwei verschiedenen Herstellern 84 Proben von diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder zur Verfügung (siehe Abschnitt 3.3.1.1, Seite 72). Auch in diesem Fall stellte sich, wie bei der Untersuchung der Rohmilchproben, die Frage nach den geeigneten Inkubationsbedingungen. Die Diät-Verordnung schreibt für die Ermittlung des Caseolytengehaltes von "unter Verwendung von Milch, Milcherzeugnissen oder Milchbestandteilen" hergestellten diätetischen Lebensmitteln für Säuglinge oder Kleinkinder in Anlage 5 eine Bebrütungstemperatur von 37 °C vor. Auch der Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- u. Forschungsanstalten (VDLUFA) legt für die Zählung von Caseolyten "in Milch, Milcherzeugnissen oder Milchbestandteilen und Lebensmitteln für Säuglinge und Kleinkinder" mit einem abgesehen von der fehlenden Caseinpeptonlösung mit CD identischen Nährboden diese Temperatur fest (Bestimmung von Eiweißzersettern (Proteoly-

ten), Verfahren mit Calcium-Caseinat-Agar (für Caseolyten), M 7.3.2 vom Januar 1985), während in einer anderen Norm des VDLUFA (Bestimmung von Eiweißzersetzern (Proteolyten), Verfahren mit Milchagar, M 7.3.3 vom Januar 1985) für die Caseolytenzählung "in Milch und Milchprodukten sowie Trink- und Brauchwasser" mit dem Milchagar nach BAIRD-PARKER (1963) eine Bebrütungstemperatur von 30 °C vorgesehen ist. Eine Inkubation bei 30 °C empfehlen auch MEYER (1975) und FORSCHNER (1976) für die Untersuchung von Säuglingsnahrung. In den eigenen Untersuchungen wurden, da hinsichtlich des Einflusses der Bebrütungstemperatur eine eindeutige Tendenz nicht zu erkennen war, alle Proben bei beiden Temperaturen untersucht.

Die Ergebnisse (Tabelle 18, Seite 74) lassen keinen eindeutigen Einfluß der Bebrütungstemperatur erkennen. Vergleicht man die geometrischen Mittelwerte, so zeigt sich, daß bei der Auswertung nach 48 h im Falle von CD, CA, CO und MA bei 37 °C eine höhere Ausbeute erzielt wurde, im Falle von CM dagegen bei 30 °C, jedoch war lediglich für CA der Unterschied schwach signifikant ($p < 0,05$) bzw. für MA, wo er sehr deutlich ausfiel, signifikant ($p < 0,01$). Bei der Auswertung nach der Säureüberschichtung nach 72 h waren die Werte im Falle von CD, CA und CO bei 37 °C höher, im Falle von CM und MA hingegen bei 30 °C, doch erwies sich im t-Test keine der Differenzen als signifikant ($p > 0,05$). Die Feststellung von FORSCHNER (1976), wonach bei Senkung der Bebrütungstemperatur von 37 °C auf 30 °C eine deutliche Verzögerung des Auftretens positiver Befunde zu registrieren sei, konnte damit nicht eindeutig bestätigt werden. Schon in den Untersuchungen von SCHÖNBERG und KÖNEKAMP (1962) mit *Bacillus* spp. hatte sich gezeigt, daß bei diesen Keimen die Ausbildung von Aufhellungshöfen nicht zwangsläufig bei 37 °C besser ist als bei 30 °C. In eigenen Untersuchungen mit *Bacillus cereus*-Kulturen (Tabelle 13, Seite 61) erwies sich zwar eine Bebrütungstemperatur von 37 °C für die Ausbildung breiterer Aufhellungshöfe im Vergleich zu 30 °C meist als günstiger, doch war der Einfluß der Temperatur auf die Zahl der als Caseolyten angezeigten Stämme sowie auf die Klarheit und Schärfe der Höfe unterschiedlich. Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, daß aerobe Sporenbildner offenbar den Hauptteil der Caseolyten in Milchtrockenprodukten für Säuglinge und Kleinkinder ausmachen (MEYER, 1975; FORSCHNER, 1976). Eigenen Untersuchungen zufolge (siehe Abschnitt 3.3.2.2, Seite 76) lag ihr Anteil an der Proteolytenflora mindestens bei etwa 35 %.

4.2.2 Einfluß der Bebrütungszeit

Auch bei den Milchtrockenprodukten ist von Interesse, ob eine endgültige Auswertung zu einem früheren Zeitpunkt als nach 72 h vertretbar wäre. In der Diät-Verordnung wurde eine Bebrütungszeit, obgleich für den Caseolytengehalt von Säuglingsnahrung ein Grenzwert festgelegt ist, unverständlicherweise nicht vorgeschrieben, was MEYER (1975) und FORSCHNER (1976) kritisch bewerten, da mit fortschreitender Dauer der Bebrütung die Zahl der Kolonien, die erkennbare Aufhellungshöfe entwickeln, sowie die Größe der Höfe selbst ansteigt (SCHÖNBERG und KÖNEKAMP, 1962). Aufgrund der in einem Ringversuch zum Caseolytennachweis entsprechend der Diät-Verordnung gesammelten Erfahrungen, wonach die höchsten Caseolytenzahlen in fast allen Fällen nach 72 h erreicht waren, schlägt MEYER (1975) diese Zeit als Bebrütungsdauer vor, "mit differenzierter Auswertung nach 24 bzw. 48 Std.". FORSCHNER (1976) dagegen hält 48 h für geeigneter, da durch diese Zeitlimitierung einigermaßen sichergestellt würde, daß damit "für das Produkt selber irrelevante Keime mit verzögerter Kaseolyse" ("sekundäre Kaseolyten"), welche primär Kohlenhydrate abbauen und erst in deren Abwesenheit nach einer längeren Adaptionszeit proteolytisch aktiv sind, nicht zur Beanstandung führten. Die oben erwähnten Normen des VDLUFA sehen eine Inkubationszeit von 72 h (M 7.3.2, mit Calcium-Caseinat-Agar) bzw. 48 h (M 7.3.3, mit Milchagar) vor. In den eigenen Untersuchungen wurden die Ansätze der Milchtrockenprodukte - wie die der Rohmilchproben - 72 h lang bebrütet und nach 24, 48 und 72 h ausgewertet. Nach der letzten Auswertung erfolgte bei allen Nährböden eine Säureüberschichtung, worauf im Abschnitt 4.3 "Elektivität der Nährböden zum Nachweis von Proteolyten" (siehe Seite 97) eingegangen wird.

In Tabelle 20 wurden die nach 48 h ermittelten Werte mit den nach 72 h (vor der Säureüberschichtung) erhaltenen Ergebnissen verglichen. Eine Berücksichtigung der 24 h-Werte erwies sich als nicht sinnvoll, da zu diesem Zeitpunkt gewöhnlich noch keine oder erst wenige Kolonien mit Aufhellungshöfen zählbar waren. Wie Tabelle 20 zeigt, erhöhten sich die Keimzahlen zwischen der zweiten Auswertung nach 48 h und der dritten Auswertung nach 72 h bei CA, CM, CO und MA in unterschiedlichem Maße um den Faktor 1,3 bis 2,7, bei CD besonders deutlich um den Faktor 4,6 bei 30 °C bzw. 4,1 bei 37 °C. Somit fiel der Anstieg der Werte zwischen 48 und 72 h uneinheitlicher aus als bei den

Tabelle 20: Korrelation der nach 48 h und der nach 72 h (vor Säureüberschichtung) erhaltenen Caseolytengehalte (Hofbreite $\geq 0,5$ mm) von 76 Proben von Milchtrockenprodukten (r = Korrelationskoeffizient; p = Überschreitungswahrscheinlichkeit)

Bebrütungs-temp.	Nährboden	Caseolyten/g (geometr. Mittel von 76 Proben)		Zunahme zwisch. 48 und 72 h (Faktor)	Anteil des 48 h-Werts am 72 h-Wert	r	p
		48 h	72 h				
30 °C	CD	9	41	4,6	22%	0,74	< 0,001
	CA	42	95	2,3	44%	0,89	< 0,001
	CM	115	149	1,3	77%	0,90	< 0,001
	CO	80	137	1,7	58%	0,95	< 0,001
	MA	65	175	2,7	37%	0,84	< 0,001
37 °C	CD	13	53	4,1	25%	0,83	< 0,001
	CA	66	120	1,8	55%	0,84	< 0,001
	CM	95	129	1,4	74%	0,73	< 0,001
	CO	114	166	1,5	69%	0,86	< 0,001
	MA	118	149	1,3	79%	0,87	< 0,001

Rohmilchproben, wo der entsprechende Faktor für alle Nährböden zwischen 1,4 und 2,1 lag (Tabelle 19, Seite 81). Jedoch erreichte damit auch bei den Milchtrockenprodukten die Zunahme der Keimzahlen bei weitem nicht die Größenordnung einer Zehnerpotenz. Auffallend ist im übrigen, daß auf CM - wie bei den Rohmilchproben - nach 48 h sowohl bei 30 °C als auch bei 37 °C etwa drei Viertel der nach 72 h schließlich gezählten hofbildenden Kolonien bereits erfaßt wurden, und daß bei den anderen Medien der entsprechende Prozentsatz bei 37 °C stets größer war als bei 30 °C. Vor allem aber besteht in allen Fällen eine enge Korrelation zwischen den 48 h-Werten und den 72 h-Werten, wie die Korrelationskoeffizienten zwischen 0,73 und 0,95 (stets $p < 0,001$) zeigen. Somit erscheint es auch bei Milchtrockenprodukten vertretbar, die Ansätze für

die Zählung von Caseolyten - gegebenenfalls unter der Voraussetzung einer Änderung des Grenzwertes - schon nach 48 h abschließend auszuwerten, wenn- gleich gerade die Milchtrockenprodukte von einer zur Zeit diskutierten Verkür- zung der Bebrütungszeit für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Milch und Milchprodukten von 72 h auf 48 h ausgenommen bleiben sollen.

4.2.3 Vergleich der Ergebnisse von den verschiedenen Nährböden untereinander

Vergleicht man die mit den einzelnen Nährböden erzielten Ergebnisse, so ergibt sich - je nach Bebrütungszeit und -temperatur - eine unterschiedliche Reihenfolge der geometrischen Mittelwerte, wobei aber CD immer die gering- ste Keimzahl aufweist. Für die relevanten Kombinationen erhält man folgende Anordnung (in Klammern jeweils das geometrische Mittel: Caseolyten/g Pulver):

Nach 48 h bei 30 °C:

CM (115) > CO (80) > MA (65) > CA (42) > CD (9)

Bei einer Überprüfung im t-Test erwiesen sich die Unterschiede CM/MA und CO/CA als schwach signifikant ($p < 0,05$), als signifikant ($p < 0,01$) der Unter- schied CM/CA und als hoch signifikant ($p < 0,001$) alle Unterschiede zwischen CD und den übrigen Nährböden.

Nach 48 h bei 37 °C:

MA (118) > CO (114) > CM (95) > CA (66) > CD (13)

Schwach signifikant ($p < 0,05$) ist hier die Differenz CO/CA, signifikant ($p < 0,01$) die Differenz MA/CA, hoch signifikant ($p < 0,001$) sind alle Unterschiede zwischen CD und den übrigen Nährböden.

Nach 72 h bei 30 °C, nach Säureüberschichtung bzw. für CD vor und nach Säu- reüberschichtung (für CD wurde auch das geometrische Mittel der vor der Säu- reüberschichtung erhaltenen Keimzahlen in den Vergleich einbezogen, da bei diesem Nährboden die Werte durch die Säurebehandlung besonders deutlich ver- ringert wurden, die Überschichtung aber nicht sinnvoll erschien; siehe hierzu im Abschnitt 4.3 "Elektivität der Nährböden zum Nachweis von Proteolyten", Seite 97):

CM (184) > MA (123) > CO (108) > CA (91) > CD (41/18)

Als signifikant ($p < 0,01$) erwiesen sich die Unterschiede CM/MA, CM/CO und

CA/CD vor Säureüberschichtung, als hoch signifikant ($p < 0,001$) die Abweichung CM/CA sowie alle übrigen Abweichungen zwischen CD (vor und nach Säureüberschichtung) und den anderen Nährböden.

Nach 72 h bei 37 °C, nach Säureüberschichtung bzw. für CD vor und nach Säureüberschichtung):

CM (158) > CO (125) > CA (117) > MA (110) > CD (53/24)

Alle Unterschiede zwischen CD (vor und nach Säureüberschichtung) und den anderen Nährböden sind auch in diesem Falle hoch signifikant ($p < 0,001$), für die anderen Differenzen besteht jedoch keine Signifikanz ($p > 0,05$).

Somit erwies sich CD hinsichtlich der Produktivität auch bei der Untersuchung der Milchtrockenprodukte in allen Fällen als den anderen Nährböden signifikant unterlegen. Vergleicht man die 48 h/30 °C-Werte, so liegen die mit den anderen Nährböden ermittelten Keimzahlen um den Faktor 4,7 (bei CA) bis 12,8 (bei CM) über den mit CD erhaltenen Resultaten, im Vergleich der 48 h/37 °C-Werte um den Faktor 5,1 (bei CA) bis 9,1 (bei MA). Die bei der letzten Auswertung nach der Säureüberschichtung mit den anderen Nährböden bestimmten Caseolytgehalte sind im Falle der Bebrütungstemperatur 30 °C um den Faktor 2,2 (bei CA) bis 4,5 (bei CM) größer als die mit CD vor der Säureüberschichtung ermittelten Werte, im Falle der Bebrütungstemperatur 37 °C um den Faktor 2,1 (bei MA) bis 3,0 (bei CM). Diese deutliche Unterlegenheit des CD in den Keimzahlen (bis über eine Zehnerpotenz) ist nicht zuletzt auch auf die bei diesem Nährboden auffallend große Zahl von Null-Werten zurückzuführen (siehe Tabelle 18, Seite 74). Diese Null-Werte, die in die Berechnung der geometrischen Mittelwerte einbezogen worden waren, indem zu den Einzelwerten je 0,5 Einheiten addiert wurden (siehe Abschnitt 3.3.2.1, Seite 73), beeinflussten die Mittelwerte deutlich. Im übrigen ist festzustellen, daß die anderen vier Nährböden sich als etwa gleichwertig erwiesen haben. Zwar erbrachte CM in drei der oben aufgeführten Fälle das höchste Ergebnis, doch ließ sich dieses nur in einem Fall gegenüber den Ergebnissen aller anderen Nährböden statistisch absichern.

Trotz seiner geringen Produktivität wies CD - ebenso wie CA - bei der Auswertung einige Vorteile gegenüber CM, CO und MA auf. Die beiden erstgenannten Nährböden, deren Caseinkonzentration besonders hoch ist (siehe Tabelle 21, Seite 100), zeichnen sich in unverändertem Zustand durch eine starke mil-

chig-weiße Trübung aus, während die drei anderen Medien durch eine mäßige (CO, MA) bis schwache (CM) Trübung charakterisiert sind. In den Ansätzen der Verdünnungsstufe 10^{-1} , die durch den hohen Eintrag an Probenmaterial zusätzlich stark getrübt wurden, waren bei CD und CA Aufhellungshöfe wegen des besseren Kontrastes zwischen den Höfen und dem unveränderten Nährboden meistens noch zu erkennen, während sie sich bei CM, CO und MA in der Regel nur schwer oder gar nicht ausmachen ließen. Diese Beobachtung deckt sich mit Befunden an CD und CM, die bei MEYER (1975) erwähnt werden. In der im Hinblick auf den Grenzwert entscheidenden Verdünnungsstufe 10^{-2} trat dieser Unterschied aber nicht auf. Als weiterer Vorteil des CD und des CA ist zu erwähnen, daß bei diesen Nährböden eine Überwucherung der Platten mit schwärmenden Kolonien nicht beobachtet werden konnte, während bei CM - nicht bei CO - eine leichte, bei MA aber eine ausgeprägte Tendenz dazu bestand.

4.3 Elektivität der Nährböden zum Nachweis von Proteolyten

Grundsätzlich sind Nährböden zum Nachweis von Proteolyten nicht selektiv. Sie gestatten auch das Wachstum nicht-proteolytischer Bakterien und machen lediglich die spezifische Enzymaktivität von Proteolyten sichtbar, wie die Untersuchungen von EIJKMAN (1901), DEMETER und MAYER (1931) und MARTLEY et al. (1970) zeigen. Allerdings werden bestimmte Keimgruppen auf einigen Nährböden in ihrer Entwicklung gehemmt. So wird nach DEMETER und MAIER (1931) und BRANDT (1939) das Wachstum von Milchsäurebakterien auf kohlenhydratfreien Caseinatnährböden weitgehend unterdrückt, eigenen Beobachtungen zufolge zeigen solche Keime auf CD, CM und CO nur sehr spärliches Wachstum. In diesem Sinne setzte BRANDT (1939) den von ihm modifizierten Caseinagar nach FRAZIER und RUPP (1928) nicht zur Zählung speziell der Caseolyten, sondern der "Nichtmilchsäurebakterien" in Butter ein.

Zur Zählung von Caseolyten in Milch und Milchprodukten werden hauptsächlich trübe Nährböden verwendet, in denen durch vollständige Hydrolyse des Substrates Casein Aufhellungszonen um die Kolonien entstehen (EIJKMAN, 1901; HASTINGS, 1904; FRAZIER und RUPP, 1928). Es wurden aber auch mehr oder weniger klare Caseinatmedien beschrieben, in denen proteolytische Enzyme durch einen unvollständigen Caseinabbau Präzipitate um die Bakterienkolonien (MARTLEY et al., 1970) bzw. die Stelle, auf die eine Enzymlösung aufgebracht wurde (CHEESEMAM, 1963; LAWRENCE und SANDERSON, 1969) erzeugen. Die

Präzipitate können durch vollständigen Caseinabbau von innen nach außen wieder verschwinden, wodurch das Bild eines Präzipitatrings entsteht (LAWRENCE und SANDERSON, 1969; MARTLEY et al., 1970). Es scheint sich bei den präzipitatbildenden mikrobiellen Enzymen um labartige Proteinasen zu handeln, welche wie das Kälberlab κ -Casein zu Para- κ -Casein abbauen, aus dem der weiße Niederschlag anfangs hauptsächlich besteht (LAWRENCE und SANDERSON, 1969).

In den Untersuchungen von MARTLEY et al. (1970) erwies sich der von diesen Autoren entwickelte klare "Standard Methods caseinate agar" (SMCA) als ein wesentlich empfindlicheres Medium als ein 10%iger Magermilchagar, was damit erklärt wird, daß dieser Nährboden mit der Ausbildung eines Niederschlags aus "Paracaseinen" das erste Stadium des Caseinabbaus anzeigt, während der Milchagar erst einen Abbau zu löslichen Produkten erkennen läßt. Letzterer Vorgang zeigt sich auf SMCA in der Entstehung einer klaren Zone innerhalb des Präzipitats, was MARTLEY et al. (1970) einer besonders hohen proteolytischen Aktivität der betreffenden Mikroorganismen zuschreiben. In den eigenen Untersuchungen konnten mit Isolaten aus Vorzugsmilch, die auf klaren Caseinatnährböden eigener Rezeptur Präzipitate bzw. Präzipitatringe ausgebildet hatten, den Beobachtungen von MARTLEY et al. (1970) entsprechende Befunde insofern erhoben werden, als von 51 auf klaren Nährböden positiven Kulturen nur 37 auf MA Caseolyse anzeigten (siehe Abschnitt 3.1.2.1.1, Seite 57). In den Experimenten mit definierten Stämmen (Tabelle 12, Seite 59) allerdings erzeugten von den auf MA, CO und SMCA untersuchten 43 Stämmen vier (*Pseudomonas cepacia* 1, *Serratia liquefaciens* 3, *Micrococcus luteus* 4 und *Bacillus sphaericus* 26) Aufhellungshöfe auf MA und CO, drei (*Pseudomonas putida*, *Alteromonas putrefaciens* 1 und *Bacillus polymyxa* 38) auf MA oder CO, wuchsen jedoch auf SMCA reaktionslos. Von den neun Kulturen, die lediglich auf SMCA und MA ausgestrichen worden waren, zeigten drei Stämme (*Escherichia coli* 6, *Escherichia coli* 7 und *Bacillus laterosporus* 6) nur auf MA Caseolyse an. Darüber hinaus bildeten fünf der auf allen drei Medien untersuchten Kulturen (*Aeromonas hydrophila* 1, "*Aeromonas liquefaciens*" 2, *Staphylococcus aureus* 1, *Bacillus mycoides* 13 und *Bacillus* sp. 2) sowie einer der nur auf SMCA und MA geprüften Stämme (*Pseudomonas* 8) auf den trüben Nährböden Aufhellungszonen aus und führten auf SMCA zu einer weiteren Klärung des ohnehin transparenten Mediums, ohne von einem Präzipitat umgeben zu sein. Offensichtlich waren also die genannten Stämme zu einer vollständigen Caseolyse befähigt,

ohne daß auf SMCA die Bildung von "Paracaseinen" angezeigt worden wäre. Ein Grund dafür könnte ein zu niedriger Gehalt dieses Mediums an Ca^{2+} gewesen sein, unter dessen Einwirkung die "Paracaseine" ausfallen. Es war die von MARTLEY et al. (1970) in der Rezeptur des SMCA angegebene $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ -Menge zugesetzt worden, doch schwankte nach Angaben dieser Autoren in ihren Untersuchungen die optimale Ca^{2+} -Menge mit der verwendeten Charge von Caseinat etwas und mußte deshalb von Fall zu Fall bestimmt werden. Ein solcher Nachteil würde die Praktikabilität des Nährbodens, der im übrigen in die 15. Auflage von "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" aufgenommen worden ist (FRANK et al., 1985), allerdings erheblich einschränken. Möglicherweise handelt es sich bei der Ausbildung von Aufhellungshöfen einerseits bzw. Präzipitaten andererseits aber auch um zwei verschiedene Enzymaktivitäten, die nicht zwangsläufig zusammen auftreten. Isoliert vorkommen kann offensichtlich sowohl die Fähigkeit, Präzipitate zu bilden (MARTLEY et al., 1970), als auch möglicherweise die Eigenschaft, Aufhellungshöfe zu erzeugen. Da die Ergebnisse von trüben und klaren Nährböden mithin nicht vergleichbar erschienen, wurden in die Untersuchungen zur Produktivität der verschiedenen Medien (siehe Abschnitt 3.2 und 3.3) ausschließlich die gebräuchlicheren trüben Nährböden einbezogen.

Bemerkenswert war im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Elektivität auch das in einigen Fällen unterschiedliche Verhalten ein und derselben Kultur auf den beiden trüben Nährböden CO und MA (Tabelle 12, Seite 59). So waren *Alcaligenes faecalis* 2, *Bacillus laterosporus* 21 und *Bacillus polymyxa* 38 nur auf MA caseolytisch aktiv, jedoch nicht auf CO, während bei *Pseudomonas putida* und *Alteromonas putrefaciens* 1 der umgekehrte Fall eintrat. Was schließlich die klaren Nährböden betrifft, so fiel auf, daß der Abbau eines Präzipitats und damit die Bildung von Präzipitaträngen offenbar an Sauerstoffzutritt gebunden ist. Von neun tiefen, d.h. unter der Agaroberfläche gelegenen Kolonien mit Präzipitat, aber ohne Ring, bildeten sieben als Ausstrichkulturen auf denselben Nährböden Präzipitatränge aus (siehe Abschnitt 3.1.2.1.1, Seite 57). Ebenso ergab sich in einem orientierenden Versuch, in dem eine Vorzugsmilchprobe sowohl im Gußplatten- als auch im Oberflächenverfahren auf klaren Nährböden eigener Rezeptur angesetzt worden war, wobei Kolonien mit Präzipitatrang und Kolonien mit Präzipitat ohne Ring getrennt erfaßt wurden, daß nach zweitägiger Bebrütung das Verhältnis der "Präzipitatrang-Kolonien" zu den

"Präzipitatkolonien" bei den Gußplatten etwa 1 : 2, bei den ausgespatelten Platten dagegen etwa 2 : 1 betrug. Von einer diesen Befunden entsprechenden Beobachtung berichtet schon EIJKMAN (1901), der feststellte, daß in Milchagar Aufhellungszonen bei tiefen Kolonien weniger deutlich sind und später auftreten als bei oberflächlichen.

Besondere Probleme hinsichtlich der Elektivität bringt die Verwendung von Milchagarmedien mit sich. Derartige Nährböden sind schon lange Zeit in Gebrauch, seitdem FREUDENREICH (1895) erstmals einen Milchagar zur Isolierung "spezifischer Milchbakterien" beschrieb und EIJKMAN (1901) die Eignung von Magermilchmedien zum Nachweis proteolytischer Eigenschaften von Mikroorganismen aufzeigte. Diese Nährböden sind leicht herzustellen und zeichnen sich durch eine hohe Produktivität aus (ZAADHOF und TERPLAN, 1967), wie sich auch in den eigenen Untersuchungen gezeigt hat. Doch schon HASTINGS (1904) wies darauf hin, daß auf Milchagar Bakterien, die beim Abbau von Lactose Säure bilden, durch eine "Lösung" des Caseins Aufhellungszonen erzeugen und damit Proteolyse vortäuschen können. Dabei klärt sich das Medium um eine Bakterienkolonie zu Beginn des sichtbaren Wachstums, um sich später, wiederum in unmittelbarer Nähe der Kolonie beginnend, erneut einzutrüben, wobei diese sekundäre Trübung die Trübung des unveränderten Nährbodens schließlich überwiegt. Es entsteht somit das Bild eines zentralen, die Kolonie unmittelbar umgebenden Präzipitats, das von einer Aufhellungszone eingefasst wird (HASTINGS, 1904; SLOBODSKA-ZAYKOWSKA, 1925; FRAZIER und RUPP, 1928). Bei schwach säuernden Keimen könnte allerdings das Auftreten des zentralen Präzipitats ausbleiben (HASTINGS, 1904). Beide Möglichkeiten falsch-positiver Ergebnisse kamen in den eigenen Untersuchungen (sowohl zur Elektivität als auch zur Produktivität) vor, wie eine Säureüberschichtung (siehe unten) zeigte. Aufhellungszonen mit zentralem Präzipitat konnte HASTINGS (1904) im übrigen auch erzeugen, indem er einen in konzentrierter Milchsäure getränkten Faden auf Milchagar auflegte. Dieser Befund war in den eigenen Versuchen mit 80%iger Milchsäure leicht reproduzierbar. Eine Erklärung des Phänomens der "Lösung" von Casein durch geringe Säuremengen konnte im Schrifttum nicht gefunden werden, abgesehen von der durch HASTINGS (1904) dargelegten Theorie (siehe Abschnitt 2.5.2, Seite 42). Ein Zusammenhang mit dem pH-Wert des Mediums besteht offensichtlich, denn dieser betrug in eigenen Untersuchungen mit 80%iger Milchsäure im Bereich des Präzipitats 3,9 - 4,5 und in der

Aufhellungszone 5,2 - 5,5, bei einem pH-Wert des unveränderten MA von 7,0 bis 7,2.

Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, empfahl HASTINGS (1904) eine Überschichtung der Platten mit einer verdünnten Mineral- oder organischen Säure, wodurch infolge einer Säurefällung des nicht hydrolysierten Caseins "unechte" Aufhellungszonen wieder trüb werden. Verschiedene Säuren wie 1%ige Salzsäure (ZAADHOF und TERPLAN, 1967; HARRIGAN und McCANCE, 1976b; FRANK et al., 1985), 1%ige Gerbsäure (LIGHTBODY, 1961; HARRIGAN und McCANCE, 1976b) oder 10%ige Essigsäure (FRANK et al., 1985) wurden zu diesem Zweck verwendet bzw. empfohlen. Oft wurde auch eine saure Quecksilberchloridlösung aus 15 g HgCl_2 , 20 ml konzentrierter Salzsäure und 100 ml Wasser eingesetzt oder für eine Säurebehandlung angegeben (BAIRD-PARKER, 1963; ZAADHOF und TERPLAN, 1967; MARTLEY et al., 1970; HARRIGAN und McCANCE, 1976b), welche erstmals von FRAZIER (1926) zur Überschichtung des von diesem Autor entwickelten Gelatineagars (siehe Tabelle 9, Seite 44) beschrieben worden war. In eigenen Untersuchungen wirkte sich eine 10minütige Behandlung mit dieser sauren Quecksilberchloridlösung einerseits bzw. 10%iger Essigsäure andererseits (10 ml/Platte) auf die Produktivität des MA nicht unterschiedlich aus. Zwar trat, wie sich bei der Überschichtung von durch 80%ige Milchsäure erzeugten Aufhellungszonen gezeigt hatte, der Effekt bei der sauren Quecksilberchloridlösung schneller ein als bei der 10%igen Essigsäure (nach 5 min bzw. 10 min), doch rechtfertigt dieser geringfügige Vorteil nicht die Verwendung einer derart toxischen Verbindung. Eine nur einminütige Säureüberschichtung mit 10%iger Essigsäure, wie sie in "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" angegeben wird (FRANK et al., 1985), erschien nach den oben erwähnten eigenen Untersuchungen zu kurz. Im übrigen könnte man mit einiger Erfahrung bei der Untersuchung von Reinkulturen dann auf die Säureüberschichtung verzichten, wenn Aufhellungshöfe in der ganzen Breite vollkommen klar und scharf begrenzt sind, wobei es sich mit großer Sicherheit um "echte" Caseolyten handelt, oder wenn eine breite Präzipitatzone um die Kolonien von einem schmalen Aufhellungssaum eingefasst wird, was für ein falsch-positives Resultat spricht.

Darüber hinaus war auch das Ergebnis einer Säureüberschichtung oft nicht eindeutig. Vereinzelt bei den Untersuchungen mit Reinkulturen und bei der Zählung von Caseolyten in Milchtrockenprodukten, sehr häufig aber bei der Zähl-

lung von Caseolyten in Rohmilch trat der Fall ein, daß Aufhellungshöfe nach der Säurebehandlung zwar etwas trüb wurden, aber nicht den Trübungsgrad des unveränderten Mediums erreichten. Solche zweifelhaften Befunde wurden als negative Ergebnisse gewertet. Auch LIGHTBODY (1961) und MARTLEY et al. (1970) erwähnen dieses Phänomen als unbefriedigenden Aspekt von Untersuchungen mit Milchagarnährböden. Möglicherweise handelt es sich bei den fraglichen Kolonien um Bakterien, die zugleich Säure bilden und proteolytisch aktiv sind, Keime, welche FRAZIER und WESTHOFF (1978a) als "acid-proteolytic" bezeichnen. In orientierenden Untersuchungen konnten die meisten derartigen Isolate als Streptococcus bzw. Enterococcus spp. identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.2.2.2, Seite 71), Keime also, die als Milchsäurebildner bekannt sind, bei denen aber zum Teil auch proteolytische Eigenschaften nachgewiesen wurden (siehe Tabelle 1, Seite 3).

Um den quantitativen Effekt einer Säureüberschichtung zu prüfen, wurden im Rahmen der Untersuchungen zur geeigneteren Bebrütungstemperatur von Rohmilchproben die Platten aller verwendeten Nährböden bei der Auswertung nach 72 h 10 min lang mit je 10 ml 10%iger Essigsäure behandelt. Auch bei trüben Caseinatnährböden ist von manchen Autoren eine Säureüberschichtung durchgeführt (ZAADHOF und TERPLAN, 1967) bzw. "zur Verbesserung der Ablesegenauigkeit" empfohlen worden (MEYER, 1975), obwohl diese Medien deshalb kohlenhydratfrei konzipiert sind, damit sich eine Säureüberschichtung erübrigt (FRAZIER und RUPP, 1928).

Vergleicht man die geometrischen Mittelwerte der Keimzahlen der Rohmilchproben (Tabelle 15 und 16, Seite 66/67), so stellt sich die Auswirkung der Säureüberschichtung für die einzelnen Nährböden unterschiedlich dar. Im Falle des CD kam es durch die Säurebehandlung bei der Untersuchung von Vorzugsmilch zu einer in allen Fällen schwach signifikanten ($p < 0,05$) Reduzierung der Keimzahlen um 14 - 31 %, bei der Untersuchung von Anlieferungsmilch zu einer solchen um 15 - 19 %, die in allen Fällen signifikant war ($p < 0,01$). Für CM waren die Keimzahlen bei der Untersuchung von Vorzugsmilch nach der Säureüberschichtung in zwei Fällen höher, in den beiden anderen Fällen niedriger, wobei sich aber diese Differenzen nicht als signifikant erwiesen. Bei der Untersuchung von Anlieferungsmilch mit demselben Medium änderten sich die Werte durch die Säurebehandlung kaum. Beim MA schließlich waren im Falle der Vorzugsmilch die Keimzahlen nach der Säureüberschichtung um 5 - 34 % geringer, wo-

bei zwei Unterschiede signifikant ($p < 0,01$), die anderen beiden jedoch nicht signifikant waren. Im Falle der Anlieferungsmilch betrug bei diesem Nährboden die Reduktion 22-28 %, wobei sich aber nur eine einzige Differenz als schwach signifikant erwies ($p < 0,05$).

Auffallend ist, daß bei MA die Säureüberschichtung nur in drei von acht Fällen eine signifikante Verminderung des Zählergebnisses zur Folge hatte. Dies dürfte bei der Vorzugsmilch zweimal auf eine absolut geringfügige Differenz (5% bzw. 10%), bei der Anlieferungsmilch wohl auch auf die geringe Probenzahl (8) zurückzuführen sein. Dagegen ergab sich für MA im nächsten Versuchsabschnitt (Tabelle 17, Seite 68) bei einem wesentlich größeren Stichprobenumfang von 150 Anlieferungsmilchproben im Falle der Kolonien mit Aufhellungshof $\geq 0,5$ mm eine hoch signifikante ($p < 0,001$) Reduktion der Werte um fast 60 %, im Falle der Kolonien mit Aufhellungshof ≥ 1 mm um nahezu 50 % ($p < 0,001$). Diese Prozentzahlen liegen in der Größenordnung der bei LIGHTBODY (1961) und MARTLEY et al. (1970) genannten Werte. In den Untersuchungen von LIGHTBODY (1961) an aus Butter isolierten Keimen erbrachten 45 %, in den Experimenten von MARTLEY et al. (1970) mit Isolaten aus roher und pasteurisierter Milch 59 % der auf Milchagar Aufhellungszonen erzeugenden Kulturen falsch-positive oder zweifelhafte Resultate. Bei FRAZIER und RUPP (1928) betrug der entsprechende Prozentsatz bei aus Milch isolierten Bakterien 37 %.

Was CM betrifft, so kamen zum Teil höhere Caseolytenzahlen nach der Säureüberschichtung zustande, daß infolge des dann größeren Kontrastes zwischen den Aufhellungshöfen und dem mäßig trüben unveränderten Nährboden manche Höfe erst völlig klar und damit zählbar erschienen. Die Tatsache, daß bei CM die Differenzen der Keimzahlen vor und nach der Säureüberschichtung nie signifikant, im Falle der Anlieferungsmilch ohnehin nur sehr klein waren, läßt darauf schließen, daß bei diesem Nährboden eine Säurebehandlung keine wesentlichen Auswirkungen auf die ermittelte Caseolytenzahl hat. Ebenso wurden auch bei CO im Rahmen orientierender Untersuchungen die Ergebnisse durch eine Säureüberschichtung kaum beeinflusst. Angesichts der Tatsache, daß CM, CO, CD und CA kohlenhydratfrei sind (siehe Abschnitt 3.1.1.1.1, Seite 49), ist die Entstehung nicht auf Proteolyse beruhender Aufhellungshöfe ohnehin schwer erklärbar. Zu berücksichtigen ist zwar auch bei den Caseinatnährböden ein möglicher Kohlenhydrateintrag mit der Probe selbst (FORSCHNER, 1976), doch läge dieser schon im Falle der bei Vorzugsmilch (siehe Tab. 14, Seite 63)

anfangs noch angesetzt, aber nach 72 h nie auswertbaren Ausgangsverdünnung 10^{-1} in der Größenordnung von nur 5 mg Lactose pro Platte, im Vergleich zu ungefähr 80–95 mg Lactose, welche bei einer MA-Platte allein im Nährboden enthalten sind. Zumindest ab der Verdünnung 10^{-2} dürfte das Einbringen von Kohlenhydraten mit dem Probenmaterial Rohmilch zu vernachlässigen sein. So gesehen könnte die stets signifikante Reduzierung des Zählergebnisses durch die Säureüberschichtung bei CD nicht auf die Eintrübung säurebedingter Aufhellungshöfe zurückzuführen sein, sondern darauf, daß vor der Säurebehandlung Kolonien mitgezählt wurden, deren Aufhellungshof gerade noch klar erschien, wobei sich aber unter oder über diesem Hof eine dünne, nicht hydrolysierte Caseinschicht befand, die sich nach der Säurefällung aufgrund der besonders hohen Caseinkonzentration dieses Nährbodens (siehe Tabelle 21, Seite 100) insofern bemerkbar machte, als der Hof dadurch "maskiert" wurde, d.h. zwar noch als solcher zu erkennen war, aber nicht mehr als völlig klar und damit bewertbar angesprochen werden konnte. Aufgrund der geschilderten Beobachtungen und Überlegungen wurde bei der folgenden Untersuchung von 150 Anlieferungsmilchproben nur noch beim MA nach der letzten Auswertung eine Säureüberschichtung durchgeführt.

Andererseits erfolgte bei der Untersuchung der Milchtrockenprodukte nach der letzten Auswertung bei allen Nährböden eine Säureüberschichtung, da diese Produkte zu 54–91 % aus Kohlenhydraten wie Glucose, Fructose, Saccharose, Lactose, Dextrinmaltose und Stärke bestanden. Der Kohlenhydrateintrag mit der Probe betrug folglich pro Platte in der Verdünnungsstufe 10^{-1} ungefähr 55–90 mg und lag damit in der Größenordnung der etwa 80–95 mg Lactose, welche eine MA-Platte schon im Nährboden enthält. Im Falle der Verdünnungsstufe 10^{-2} wurden mit der Probenverdünnung pro Platte demnach circa 6–9 mg Kohlenhydrate in den Nährboden eingebracht. Zumindest in der Verdünnung 10^{-1} war also auch bei den Caseinatnährböden mit falsch-positiven Befunden zu rechnen. Zu einer deutlichen Senkung des Zählergebnisses bei den Milchtrockenprodukten (Tabelle 18, Seite 74) führte die Säureüberschichtung bei CD (um 56 % bei 30 °C bzw. 55 % bei 37 °C), CO (um 21 % bei 30 °C bzw. 25 % bei 37 °C) und MA (um 30 % bei 30 °C bzw. 26 % bei 37 °C), wobei die Differenz bei beiden Temperaturen bei CD hoch signifikant ($p < 0,001$), bei MA signifikant ($p < 0,01$) und bei CO schwach signifikant ($p < 0,05$) war, während sich bei CA die Werte nicht signifikant verminderten und bei CM eine (nicht signifikante) Erhöhung resultierte. Aufhellungshöfe, deren Aussehen – Präzipitatzone unmittelbar

um die Kolonie, die von einer klaren Zone umgeben ist (HASTINGS, 1904; SLOBODSKA-ZAYKOWSKA, 1925; FRAZIER und RUPP, 1928) - darauf hindeutete, daß es sich wohl um "falsch-positive" Ergebnisse handelte, waren bei den Caseinatnährböden allerdings ausschließlich in der Verdünnungsstufe 10^{-1} und hier nur bei CM und CO zu beobachten. In diesem Zusammenhang wurde in orientierenden Untersuchungen ein Streptococcus lactis-Stamm (DSM 20 481), welcher auf MA deutliche nicht auf Proteolyse beruhende Aufhellungszonen erzeugte, auf CD, CA, CM und CO ausgestrichen, wobei in die Nährböden pro Platte jeweils 5, 10, 20, 30 usw. bis zu 100 mg Lactose eingegossen worden waren. Der Keim wuchs in allen Fällen, erzeugte auf CD und CA aber keine Aufhellungszonen, sondern lediglich ein Präzipitat. Auffallend war, daß die Kultur auf CM bei Zusatz von 5 mg Lactose keine Hofbildung zeigte, ab 10 mg "echte" Caseolyse (d.h. die Aufhellungszonen blieben nach der Säurebehandlung klar), bei keiner der geprüften Lactosekonzentrationen dagegen ein "falsch-positives" Resultat. Allein auf CO war bei Lactosegehalten von mehr als 10 mg ein typisches "falsch-positives" Bild zu beobachten. Insgesamt gesehen deutet dies darauf hin, daß die mit der Verdünnung 10^{-2} in die Caseinatnährböden eingebrachte Kohlenhydratmenge (ca. 6-9 mg/Platte) vermutlich nicht ausreicht, infolge bakterieller Vergärung nicht proteolysebedingte Aufhellungshöfe zu erzeugen. Überhaupt scheinen CD und CA eine zu starke Trübung aufzuweisen, als daß durch Säureeinwirkung ein auswertbarer Aufhellungshof zustande kommen könnte. So ließen sich im Rahmen orientierender Untersuchungen, bei denen in Anlehnung an die Arbeit von HASTINGS (1904) 80%ige Milchsäure mit einem darin getränkten Faden auf verschiedene Nährböden aufgebracht wurde, zwar auf MA, CM und CO in unterschiedlichem Ausmaß tatsächlich Aufhellungszonen (zentrales Präzipitat mit peripherem Aufhellungssaum) erzeugen, nicht dagegen auf CD und CA. Hier trat lediglich Präzipitatabildung ein. Dies entspricht den Beobachtungen von FORSCHNER (1976). Die hoch signifikante Verminderung der auf CD ermittelten Caseolytengehalte der Milchtrockenprodukte durch die Säureüberschichtung ist somit wohl ebenfalls mit der oben im Zusammenhang mit der Rohmilchuntersuchung geschilderten Theorie zu erklären. Daß bei CA nicht derselbe Effekt auftrat wie bei CD, dürfte auf einer leichteren enzymatischen Spaltbarkeit des autoklavierten Caseins des CA im Vergleich zu dem im Dampftopf erhitzten Casein des CD zurückzuführen sein, weshalb nicht hydrolysierte Caseinschichten unter oder über den Aufhellungshöfen bei diesem Medium wohl selten waren.

Alles deutet also darauf hin, daß bei CD (und prinzipiell auch bei CA) durch eine Säureüberschichtung Höfe wieder teilweise trüb werden, welche tatsächlich durch Proteolyse entstanden sind. Eine Säurebehandlung dieser Nährböden erscheint somit nicht sinnvoll. Daß bei CD und CA Aufhellungshöfe offenbar ausschließlich durch Proteolyse zustande kommen, stellt zwar einen Vorteil dieser Nährböden hinsichtlich ihrer Elektivität dar. Diesem Vorteil steht aber die aufwendige Herstellung beider Medien entgegen, bei CD zusätzlich die geringe Produktivität. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß die Differenzen der Proteolytenzahlen vor und nach der Säureüberschichtung bei CD auch deshalb so deutlich ausgefallen sind, weil nach der Säurebehandlung die Zahl der Null-Werte, welche die Mittelwerte stark beeinflussten, etwa doppelt so groß war wie davor (siehe Tabelle 18, Seite 74).

Im Rahmen der Untersuchungen zur Elektivität der verschiedenen Nährböden wurde schließlich auch der Frage nachgegangen, inwiefern drei Caseinatmedien (CD, CA und CM) in der Lage waren, unterschiedliche *Bacillus cereus*-Stämme als Caseolyten anzuzeigen. Diese pathogenen Proteolyten, die in Säuglings- und Kleinkindernahrung nicht selten nachzuweisen sind (BECKER et al., 1984), müßten nach FORSCHNER (1976) auf CD als hofbildende Kolonien erfaßt werden. Jedoch ließen auf diesem Nährboden von 20 *Bacillus cereus*-Kulturen nach 48stündiger Bebrütung bei 30 °C lediglich 17, bei 37 °C sogar nur 13 Kulturen caseolytische Eigenschaften erkennen, während auf CA und CM 19 bzw. 20 Kulturen als Caseolyten registriert wurden (siehe Abschnitt 3.1.2.2, Seite 58).

4.4 Bemerkungen zur Praktikabilität und zur Zusammensetzung einiger Nährböden

Die Annahme, daß bei CD mit der lediglich im Dampftopf erhitzten Lösung 1 Bakteriensporen und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit Caseolyten (FRAZIER und WESTHOFF, 1978a) in das Medium gelangen, die durch den Kochprozeß noch aktiviert werden (KEYNAN und EVENCHIK, 1969), hat sich in orientierenden Untersuchungen bestätigt. So wuchsen auf unbeimpften CD-Platten nach zwei- bis dreitägiger Bebrütung bei 37 °C einzelne Kolonien caseolytisch aktiver Sporenbildner. Um das Einbringen solcher Keime in den unbeimpften Nährboden sicher zu vermeiden, wurde bei der als CA bezeichneten Modifikation des CD die nach der Arbeitsvorschrift der Diät-Verordnung hergestellte Caseinatlösung 15 min bei 121 °C autoklaviert, wodurch sich die Lösung nicht sinn-

Tabelle 21: Vergleich der Zusammensetzung des Caseinagars nach FRAZIER und RUPP (1928), des Caseinagars nach FRAZIER und RUPP, modifiziert nach BRANDT (1939), des CM (gleiche Zusammensetzung wie CO) und des CD:

Bestandteil	Konzentration (g/l)			
	FRAZIER	BRANDT	CM/CO	CD
Pepton aus Fleisch	(10 ml doppelt	0,1	5,0	0,09
Fleisch-extrakt	konzentr. Bouill./l)	0,06	3,0	0,05
Caseinpepton	-	-	-	9,1 ¹
Casein nach Hammarsten	3,5	3,5	2,5	10,61
NaCl	-	0,1	5,0	0,09
Ca(OH) ₂	(72 ml gesättigt. Kalkwasser pro l)	(100 ml gesättigt. Kalkwasser pro l)	0,15	(303 ml gesättigt. Kalkwasser pro l)
CaCl ₂	0,15	0,15	0,05	0,014
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,105	0,105	-	0,095 ²
KH ₂ PO ₄	0,035	0,035	-	-
K ₂ HPO ₄	-	-	-	0,032
K-Citrat	0,35	-	-	-
Agar	15,0	15,0	13,5	20,45

Anmerkungen: ¹) Bei Verwendung einer 10%igen Lösung (SCHÖNBERG und KRAUS (1958).

²) In der aktuellen Fassung der Diät-Verordnung vom 21. Januar 1982 steht "Na₂HPO₄ x H₂O" (vergleiche Seite 50).

fällig veränderte. Im übrigen haben auch FRAZIER und RUPP (1928) die Caseinatlösung des von ihnen entwickelten Nährbodens autoklaviert. Der CA zeichnete sich im Vergleich zu CD durch breitere und schärfer begrenzte Aufhellungshöfe und eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der caseolytischen Aktivität von *Bacillus cereus*-Kulturen (siehe Abschnitt 3.1.2.2, Seite 58) sowie durch eine signifikant höhere Produktivität (siehe Abschnitt 4.1.3, Seite 82, und 4.2.3, Seite 88) aus.

Die Anfertigung der in ihrer mengenmäßigen Zusammensetzung identischen Nährböden CM und CO ist, folgt man den Anweisungen der Hersteller, kompliziert und zeitaufwendig. In eigenen Untersuchungen konnten beide Medien ohne nachteilige Auswirkungen auf Produktivität und Elektivität durch Aufkochen auf Magnetstabrührer gelöst werden. Ein Nachteil des CM war, daß er vor dem Gießen beim Aufrühren leicht schäumte und dieser Schaum nur durch erneutes Aufkochen vollständig beseitigt werden konnte..

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß die von der Fa. Merck für CM gewählte Bezeichnung Calcium-Caseinat-Agar "nach FRAZIER a. RUPP (1928), modifiziert von BRANDT (1939)" nicht zutrifft. Wie aus Tabelle 21 hervorgeht, stimmt CM hinsichtlich der Zusammensetzung weder mit dem Medium nach FRAZIER und RUPP (1928) noch mit dem nach BRANDT (1939) überein.

4.5 Zählung von Caseolyten in Säuglingsnahrung im Hinblick auf gesundheitliche Risiken

Der in § 14 Abs.2 Nr.4c der Verordnung über diätetische Lebensmittel vom 20. Juni 1963 geforderte Caseolytennachweis in Säuglingsnahrung war aus Gründen des Gesundheitsschutzes eingeführt worden (siehe Seite 77). Im internationalen Vergleich scheint eine solche Vorschrift jedoch eher die Ausnahme zu sein. Wie einer Gegenüberstellung mikrobiologischer Qualitätsanforderungen für getrocknete Säuglings- und Kleinkindernahrung von sechzehn europäischen sowie außereuropäischen Ländern und von vier internationalen Vereinbarungen bzw. Empfehlungen (u.a. FAO/WHO und ICMSF) zu entnehmen ist, gibt es in der BRD, der DDR und Algerien einen Grenzwert für Caseolyten, welcher in beiden deutschen Staaten bei 150/0,1 g liegt (Algerien: $< 10^2$ /g), während man in den anderen aufgeführten Ländern sowie im Rahmen der in dem Vergleich berücksichtigten internationalen Empfehlungen dieser Bakteriengruppe lebensmit-

telhygienisch offensichtlich keine Bedeutung zumißt (WIESE, 1986). Der Hauptgrund für Letzteres dürfte darin zu sehen sein, daß nach neueren Untersuchungen vielen der früher als "unspezifisch" bezeichneten "Lebensmittelvergiftungen" wohl eher spezifische pathogene Prinzipien ganz bestimmter Keime zugrunde liegen, als zum Beispiel die Freisetzung toxischer Eiweißspaltprodukte durch verschiedene proteolytisch aktive Bakterien (siehe hierzu Abschnitt 2.3.3, Seite 27), wodurch der Sinn der Erfassung einer ganzen Bakteriengruppe zur Abschätzung eines gesundheitlichen Risikos in Frage gestellt wird. In diesem Zusammenhang wird in der Bundesrepublik Deutschland die Streichung der entsprechenden Vorschrift diskutiert. Trotz der umstrittenen Aussagefähigkeit von Proteolytengehalten für eine gesundheitliche Beurteilung des Produktes dürfte die Zählung von Caseolyten aber doch zur Einschätzung des Verderbspotentials von Säuglingsnahrung (FORSCHNER, 1976) von Bedeutung sein und darüber hinaus einen Anhaltspunkt für die Bewertung der Hygienesituation im Herstellerbetrieb sowie - vor allem Sporenbildner betreffend - auch in den landwirtschaftlichen Erzeugerbetrieben des betreffenden Einzugsbereichs bieten. Die Ermittlung von Proteolytgehalten unter dem Gesichtspunkt des Lebensmittelverderbs kann im übrigen besonders bei Rohmilch im Hinblick auf die Haltbarkeit der daraus hergestellten Produkte sinnvoll sein (FRANK et al., 1985).

In einigen Staaten sowie im Rahmen von Empfehlungen verschiedener internationaler Organisationen existieren Grenzwerte für bestimmte pathogene Proteolytenspecies in Säuglingsnahrung (WIESE, 1986). So begrenzen mehrere europäische Länder den Gehalt an *Bacillus cereus*, einem Keim, der in Säuglings- und Kleinkindernahrung nicht selten nachzuweisen ist (BECKER et al., 1984), in unterschiedlichem Maße auf Werte im Bereich von 10^2 - 10^4 /g (BECKER et al., 1984; WIESE, 1986). Daß im Schrifttum Berichte über durch den Genuß von Säuglings- und Kleinkindernahrung bedingte *Bacillus cereus*-Intoxikationen nicht gefunden werden konnten, dürfte auf den in der Regel geringen *Bacillus cereus*-Gehalten dieser Produkte beruhen. So ließ sich in den Untersuchungen von BECKER et al. (1984) diese Species zwar in 64 von 206 Proben von Säuglings- und Kleinkindernahrung sowie Einzelkomponenten dieser Lebensmittel nachweisen, doch lagen die entsprechenden Keimzahlen nur bei zwei Proben über 100/g. In diesem Zusammenhang sei noch einmal darauf hingewiesen, daß in den eigenen Untersuchungen von 20 *Bacillus cereus*-Stämmen auf CD nach 48stündiger Bebrütung bei 30 °C lediglich 17, bei 37 °C sogar nur 13 Kulturen caseolytisch aktiv waren (siehe Abschnitt 3.1.2.2, Seite 58).

5. Zusammenfassung

1. Da im Schrifttum eine Fülle von Arbeiten über Proteolyten in Lebensmitteln, insbesondere in Milch und Milchprodukten, vorliegt, wurden diese in einer umfangreichen Literaturübersicht zusammengestellt.
2. Im ersten Abschnitt der eigenen Untersuchungen wurden trübe Nährböden (ein 10%iger Magermilchagar (MA) und ein Caseinat-Fertignährboden des Handels (CO)) und klare Nährböden ("Standard Methods caseinate agar (SMCA)" von MARTLEY et al. (1970) und Nährböden eigener Rezeptur) zum Nachweis von Proteolyten anhand des Wachstums von Reinkulturen saprophytärer und pathogener Keime hinsichtlich der Elektivität verglichen. Von 51 auf klaren Nährböden positiven Isolaten aus Rohmilch zeigten nur 37 auf MA Proteolyse an. Andererseits waren von 52 definierten Stämmen 16 auf mindestens einem der beiden trüben Nährböden proteolytisch aktiv, ließen aber auf SMCA keine proteolytischen Eigenschaften erkennen. Da die Ergebnisse von trüben und klaren Nährböden mithin nicht vergleichbar erschienen, wurden in die Untersuchungen zur Produktivität der Nährböden ausschließlich die gebräuchlicheren trüben Medien einbezogen.
3. Im zweiten Versuchsabschnitt wurden mit dem "Calcium-Caseinpeptonagar" (CD) nach SCHÖNBERG und KRAUS (1958), einem Caseinat-Fertignährboden des Handels (CM) und mit MA zuerst die Bebrütungstemperaturen 30 °C und 37 °C hinsichtlich der Produktivität der Nährböden bei der Untersuchung von Rohmilch auf Proteolyten verglichen. Dabei waren die erhaltenen Keimzahlen bei 30 °C stets höher. Die folgende Untersuchung von 150 Anlieferungsmilchproben bei 30 °C auf CD, CA (derselbe Nährboden wie CD in einer geringfügigen Modifikation, wobei die Caseinatkomponente nicht im Dampftopf erhitzt, sondern autoklaviert wurde), CM, CO und MA erbrachte sowohl für die Auswertung nach 48 h als auch für die Auswertung nach 72 h bei den verschiedenen Nährböden meist signifikant voneinander abweichende Proteolytenzahlen, wobei CD stets den niedrigsten Wert aufwies, gefolgt von CA. Die nach 72 h ermittelten Werte lagen um den Faktor 1,4 - 2,1 über den nach 48 h erhaltenen Ergebnissen, wobei in allen Fällen mit Korrelationskoeffizienten von 0,78 - 0,95 zwischen den bei beiden Bebrütungszeiten bestimmten Keimzahlen eine enge Korrelation bestand.

4. Im dritten Versuchsabschnitt wurden 84 Proben von Säuglings- und Kleinkindernahrung mit CD, CA, CM, CO und MA bei 30 °C und 37 °C und Bebrütungszeiten von 48 h und 72 h untersucht. Ein eindeutiger Einfluß der Bebrütungstemperatur auf die Produktivität ließ sich nicht erkennen. Im Vergleich der Ergebnisse von den verschiedenen Nährböden untereinander schnitt CD stets am schlechtesten ab, während CA, CM, CO und MA sich als etwa gleichwertig erwiesen. Die nach 72 h erhaltenen Werte lagen bei CA, CM, CO und MA um den Faktor 1,3 - 2,7, bei CD um den Faktor 4,6 bei 30 °C bzw. 4,1 bei 37 °C über den nach 48 h ermittelten Ergebnissen, wobei in allen Fällen mit Korrelationskoeffizienten von 0,73 - 0,95 eine enge Beziehung zwischen den bei beiden Bebrütungszeiten ermittelten Keimzahlen bestand.
5. Eine Säureüberschichtung zum Ausschluß falsch-positiver Resultate durch Säurebildung aus Kohlenhydraten erwies sich nur bei MA als notwendig, ergab aber oft auch zweifelhafte Befunde. Bei CD und CA ist eine Säureüberschichtung nicht sinnvoll.

Summary

Comparison of different media for detection of proteolytic bacteria in raw milk and infant food

1. The literature contains an extensive review of publications on proteolytic bacteria in foods, especially milk and dairy products.
2. In the first section of the investigations pure cultures of saprophytic and pathogenic bacteria were used to compare the elective properties of opaque media (a 10 % skim milk agar (MA) and a commercially available caseinate medium (CO)) and clear media ("Standard Methods caseinate agar (SMCA)" of MARTLEY et al. (1970) and media of own composition) for the detection of proteolytic microorganisms. Only 37 out of 51 cultures isolated from raw milk, which were positive on clear media, showed proteolysis on MA. On the other hand, of 52 defined strains, 16 were proteolytic at least on one of the opaque media, without exhibiting proteolytic activity on SMCA. It can be concluded that the results obtained with opaque and clear media were not totally comparable. Thus, only the more common opaque media were included in the investigations concerning productivity.
3. The second section of the experiments dealt with the examination of raw milk. When testing the influence of incubation temperature (30 °C and 37 °C) on productivity, the media used were the "Calcium-Caseinpeptonagar" (CD) according to SCHÖNBERG and KRAUS (1958), a commercially available caseinate medium (CM), and MA. The counts obtained at 30 °C were always higher. Subsequently, 150 samples of raw milk were examined at 30 °C with CD, CA (the same medium as CD but slightly modified by autoclaving the caseinate component instead of heating it in the steamer), CM, CO and MA for different periods of incubation (48 h and 72 h). The proteolytic counts obtained with the five media differed significantly in most cases. CD invariably presented the lowest value, followed by CA. The counts found after 72 h were higher by a factor of 1.4 - 2.1. In all cases correlation coefficients ranging from 0.78 - 0.95 showed a close correlation between the values determined at the two incubation times.

4. In the third section 84 samples of infant food were examined with -CD, CA, CM, CO and MA for 48 h and 72 h at 30 °C and 37 °C. A clear influence of the incubation temperature on productivity could not be detected. When comparing the results from the different media, those obtained with CD were invariably the lowest, whereas CA, CM, CO and MA proved to be equally good. For CA, CM, CO and MA, the values obtained after 72 h were higher by a factor of 1.3 - 2.7 than the values determined after 48 h. For CD, this factor was 4.6 at 30 °C and 4.1 at 37 °C, respectively. In all cases correlation coefficients between 0.73 and 0.95 showed a close correlation between the values determined at the two incubation times.
5. Flooding plates with acid to avoid false-positive results caused by acid production from carbohydrates seems to be necessary only when using MA. However, doubtful findings often occurred. Flooding plates is not suitable for CD and CA.

6. Literaturverzeichnis

ADAM, W. (1958):

Die quantitative bakteriologische Lebensmitteluntersuchung bei der Diagnose der unspezifischen Lebensmittelvergiftungen sowie der Lebensmittelüberwachung. Arch. Hyg. Bakt. 142, 232-240

ADAMS, D.M., J.T. BARACH und M.L. SPECK (1975):

Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin.

J. Dairy Sci. 58, 828-834

AHEARN, D.G., S.P. MEYERS und R.A. NICHOLS (1968):

Extracellular proteinases of yeasts and yeastlike fungi.

Appl. Microbiol. 16, 1 370 - 1 374

ANONYM (1973):

Reallexikon der Medizin und ihrer Grenzgebiete, Band 5, p. P322.

Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien

ARNOLD, D.R., und R.G. MURPHY (1975):

Rapid casein hydrolysis within the family Enterobacteriaceae. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology 75, 276

BAIRD-PARKER, A.C. (1963):

A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests.

J. Gen. Microbiol. 30, 409-427

DERSELBE (1965):

The classification of staphylococci and micrococci from world-wide sources.

J. Gen. Microbiol. 38, 363-387

BAKER, S.K. (1983):

The keeping quality of refrigerated pasteurized milk.

Aust. J. Dairy Technol. 38, 124-127

BARACH, J.T., D.M. ADAMS und M.L. SPECK (1976a):

Low temperature inactivation in milk of heat-resistant proteases from psychrotrophic bacteria.

J. Dairy Sci. 59, 391-395

DIESELBEN (1976b):

Stabilization of a psychrotrophic Pseudomonas protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultrahigh temperature.

Appl. Environ. Microbiol. 31, 875-879

DIESELBEN (1978):

Mechanism of low temperature inactivation of a heat-resistant bacterial protease in milk.

J. Dairy Sci. 61, 523-528

- BAUMANN, P., M.J. GAUTHIER und L. BAUMANN (1984):
Genus *Alteromonas* Baumann, Baumann, Mandel and Allen 1972, 418^{AL}.
in: KRIEG, N.R., und J.G. HOLT: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,
Band 1, 1. Aufl., p. 343-352
Williams and Wilkins, Baltimore, London
- BECKER, H., T.A. EL-BASSIONY und G. TERPLAN (1984):
Zum Vorkommen von *Bacillus cereus* und anderen pathogenen Mikroorganismen
in Säuglings- und Kleinkindernahrung.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 179, 198-216
- BHADSAVLE, C.H., T.E. SHEHATA und E.B. COLLINS (1972):
Isolation and identification of psychrophilic species of clostridium from milk.
Appl. Microbiol. 24, 699-702
- BINDER, E., und E. BRANDL (1984):
Der Gehalt an Tyramin und Histamin in Österreichischem Käse.
Österr. Milchw. 39, Wiss. Beil. 1, 1-7
- BLACKWELL, B. (1963):
Tranylcypromine.
Lancet 1963 II, 414
- BLACKWELL, B., und L.A. MABBITT (1965):
Tyramine in cheese related to hypertensive crises after monoamineoxidase in-
hibition.
Lancet 1965 I, 938-940
- BLAU, G., und G. KIELWEIN (1985):
Die Erzeugung von Qualitätsmilch, 1. Aufl., p. 81.
Verlag der Ferber'schen Universitätsbuchhandlung, Gießen
- BOETHLING, R.S. (1975):
Purification and properties of a serine protease from *Pseudomonas maltophilia*.
J. Bacteriol. 121, 933-941
- BONTEMPS, M., und C. SIMON (1965):
Über den Keimgehalt von pulverisierten Fertignahrungen für Säuglinge.
Milchwissenschaft 20, 508-509
- BRANDSAETER, E., und F.E. NELSON (1956):
Proteolysis by *Lactobacillus casei*. I. Proteinase activity.
J. Bacteriol. 72, 68-72
- BRANDT, H. (1939):
Die bakteriologische Untersuchung der Butter und ihre Auswirkung.
Molkerei-Zeitung Hildesheim 53, 262-264
- BREED, R.S., E.G.D. MURRAY und N.R. SMITH (1957):
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7. Aufl., p. 666-667.
The Williams and Wilkins Company, Baltimore
- BRUNNER, J.R., C.A. ERNSTROM, R.A. HOLLIS, B.L. LARSON, R.McL. WHIT-
NEY und C.A. ZITTLE (1960):
Nomenclature of the proteins of bovine milk - first revision.
J. Dairy Sci. 43, 901-911

BRYAN, F.L. (1979):

Infections and intoxications caused by other bacteria. in: RIEMANN, H. und F.L. BRYAN: Food-borne infections and intoxications, 2. Aufl., p. 211-297
Academic Press, New York

BULLING, E. (1959):

Bakteriologische Untersuchungen an Säuglings- und Kindermilchpräparaten.
Z. Kinderheilk. 82, 113-118

BURKE, V., J. ROBINSON, J. BEAMAN, M. GRACEY, M. LESMANA, R. ROCK-HILL, P. ECHEVERRIA und J.M. JANDA (1983):

Correlation of enterotoxicity with biotype in *Aeromonas* spp..
J. Clin. Microbiol. 18, 1196-1200

BURNETT, G.W., M.J. PELCZAR, Jr., und H.J. CONN (1957):

Preparation of media. in: PELCZAR, M.J., Jr.: Manual of Microbiological Methods, p. 37-63
Mc Graw-Hill Book Company, New York

BURTON, H. (1969):

Ultra-high-temperature processed milk.
Dairy Sci. Abstr. 31, 287-297

BURTON, H., J.G. FRANKLIN, D.J. WILLIAMS, H.R. CHAPMAN, A. JEAN, W. HARRISON und L.F.L. CLEGG (1959):

An analysis of the performance of an ultra-high-temperature milk sterilizing plant. IV. Comparison of experimental and calculated sporicidal effects for a strain of *Bacillus stearothermophilus*.
J. Dairy Res. 26, 221-226

CANALE-PAROLA, E. (1974):

Genus IV. *Sarcina* Goodsir 1842, 434. in: BUCHANAN, R.E., und N.E. GIBBONS: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Aufl., p. 527-528
The Williams and Wilkins Company, Baltimore

CANNON, R.Y. (1972):

Contamination of raw milk with psychrotrophic sporeformers.
J. Dairy Sci. 55, 669

CATO, E.P., W.L. GEORGE und S.M. FINEGOLD (1986):

Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23^{AL}.
in: SNEATH, P.H.A., N.S. MAIR, M.E. SHARPE und J.G. HOLT: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Band 2, 1. Aufl., p. 1141-1200
Williams and Wilkins, Baltimore, London

CHEESEMAN, G.C. (1963):

Action of rennet and other proteolytic enzymes on casein in casein-agar gels.
J. Dairy Res. 30, 17-22

CHOPRA, A.K., und D.K. MATHUR (1984):

Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products.
J. appl. Bact. 57, 263-271

DIESELBEN (1985):

Purification and characterization of heat-stable proteases from *Bacillus stearothermophilus* RM-67.

J. Dairy Sci. 68, 3202-3211

CHOUDHERY, A.K., und E.M. MIKOLAJCIK (1969):

Rennin-like activity in milk of *Bacillus cereus*.

J. Dairy Sci. 52, 896-897

CHRISTOPHERSEN, J. (1980):

Über den Einfluß thermischer Behandlung auf Proteasen in Lebensmitteln.

Zeitschrift für Lebensmittel-Technologie und -verfahrenstechnik 31, 43-46

CIBLIS, E., und G. SCHWARZ (1962):

Bakteriologische Beschaffenheit und Haltbarkeit von aus Magermilchpulver und frischem Schlagrahm rekonstituierter Milch.

Milchwissenschaft 17, 621-624

CLAYDON, T.J., und B.W. HAMMER (1939):

Bacteriology of butter. VIII. Relationship of *Achromobacter putrefaciens* to the putrid defect of butter.

Iowa Agr. Expt. Sta. Research Bull. 267, zit. n. WAGENAAR (1952)

COHEN, B.L. (1977):

The proteases of *Aspergilli*.

in: SMITH, J.E., und J.A. PATEMAN: Genetics and Physiology of *Aspergillus*, p. 281-292

Academic Press, New York and London

COLLINS, E.B. (1981):

Heat resistant psychrotrophic microorganisms.

J. Dairy Sci. 64, 157-160

COLLINS, M.D., D. JONES, J.A.E. FARROW, R. KILPPER-BÄLZ und K.H. SCHLEIFER (1984):

Enterococcus avium nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov.

Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 220-223

COLONNA, P., und J. ADDA (1976):

Dosage de la tyramine, histamine et tryptamine dans quelques fromages français.

Le Lait 56, 143-153

CORETTI, K. (1958):

Rohwurstfehlfabrikate durch Laktobazillen.

Fleischwirtsch. 10, 218-225

COUSIN, M.A. (1981):

Proteolytic activity of psychrotrophic microorganisms on milk and dairy products.

in: ROBERTS, T.A., G. HOBBS, J.H.B. CHRISTIAN und N. SKOVGAARD:

Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity, p. 63-72

Academic Press, London

COUSIN, M.A., und E.H. MARTH (1977):

Changes in milk proteins caused by psychrotrophic bacteria.
Milchwissenschaft 32, 337-341

CREWETHER, W.G., und F.G. LENNOX (1950):

Preparation of crystals containing protease from *Aspergillus oryzae*.
Nature 165, 680

DAHLBERG, A.C., und F.V. KOSIKOWSKI (1948):

The relationship of the amount of tyramine and the numbers of *Streptococcus faecalis* to the intensity of flavour in American Cheddar cheese.
J. Dairy Sci. 31, 305-314

DAINTY, R.H., B.G. SHAW, K.A. DE BOER und E.S.J. SCHEPS (1975):

Protein changes caused by bacterial growth on beef.
J. appl. Bact. 39, 73-81

DeBEUKELAR, N.J., R.L. BRADLEY, Jr., und E.H. MARTH (1975):

Modification of milk proteins by psychrotrophic bacteria.
J. Dairy Sci. 58, 785

DeBEUKELAR, N.J., M.A. COUSIN, R.L. BRADLEY, Jr., und E.H. MARTH (1977):

Modification of milk proteins by psychrotrophic bacteria.
J. Dairy Sci. 60, 857-861

DEMETER, K.J. (1956a, b, c, d):

Mikrobiologie der Butter, p. 88, 141-151, 164-165, 197-199.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

DEMETER, K.J., und F.X. MAIER (1931):

Vergleichende Untersuchungen über mikrobiologische Beschaffenheit und Qualitätsbefund von Sauerrahmbutter. I. Mitteilung. Einleitung, Literaturübersicht und Methodik bei Bestimmung der Mikroorganismen in Butter.
Milchwirtsch. Forschgn 11, 418-436

DERBY, H.A., und B.W. HAMMER (1931):

Bacteriology of butter. IV. Bacteriological studies on surface taint butter.
Iowa Agr. Expt. Sta. Research Bull. 145, zit. n. WAGENAAR (1952)

DE VUYST, A., W. VERVACK und M. FOULON (1976):

Détection d'amines non volatiles dans quelques fromages.
Le Lait 56, 414-422

DOUGLAS, H.M.G., J. HUISMAN und J.P. NATER (1967):

Histamine intoxication after cheese.
Lancet 1967 II, 1 361-1 362

DOUDOROFF, M., und N.J. PALLERONI (1974):

Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237 Nom. cons. Opin. 5, Jud. Comm. 1952, 121. in: BUCHANAN, R.E., und N.E. GIBBONS: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Aufl., p. 217-243
The Williams and Wilkins Company, Baltimore

DRUCE, R.G., und S.B. THOMAS (1959):
The microbiological examination of butter.
J. appl. Bact. 22, 52-56

EASMON, C.S.F., und C. ADLAM (1983):
Staphylococci and Staphylococcal Infections, Band 1 und 2.
Academic Press, London

EIJKMAN, C. (1901):
Ueber Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen.
Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten,
I. Abt. 29, 841-848

EMALDI, G.C., P. TOPPINO, M.G. BOSSI, S. CARINI, R. LODI, A. VEZZONI,
I. NIZZOLA und B. ALBERINI (1977):
La presenza di sporigeni anaerobi nei foraggi e nelle feci di bovine da latte.
Industria del Latte 13, 47-81
zit. n. Dairy Sci. Abstr. 39 (1977), 704

EMMONS, D.B., W.A. MCGUGAN, J.A. ELLIOTT und P.M. MORSE (1962):
Effect of strain of starter culture and of manufacturing procedure on bitterness and protein breakdown in Cheddar cheese.
J. Dairy Sci. 45, 332-342

EXTERKATE, F.A. (1975):
An introductory study of the proteolytic system of *Streptococcus cremoris* strain HP.
Neth. Milk Dairy J. 29, 303-318

DERSELBE (1976):
Comparison of strains of *Streptococcus cremoris* for proteolytic activities associated with the cell wall.
Neth. Milk Dairy J. 30, 95-105

EZZAT, N., M. EL SODA, C. BOUILLANNE, C. ZEVACO und P. BLANCHARD (1985):
Cell wall associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis*.
Milchwissenschaft 40, 140-143

FAIRBAIRN, D.J., und B.A. LAW (1986):
Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control.
J. Dairy Res. 53, 139-177

FERMI, C. (1890):
Die Leim und Fibrin lösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen.
Arch. Hyg. 10, 1-54

FLORMAN, A.L., und N. SCHIFRIN (1950):
Observations on a small outbreak of infantile diarrhea associated with *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Pediat. 36, 758-766

FORSCHNER, E. (1976):

Zur Problematik bakteriologischer Untersuchungen nach der Diät-VO unter besonderer Berücksichtigung des Kaseolytennachweises.
Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 72, 202-207

FOSTER, A.R. (1963):

Tranylcypromine and cheese.
Lancet 1963 II, 587

FRANK, J.F., L. HANKIN, J.A. KOBURGER und E.H. MARTH (1985):

Tests for groups of microorganisms.

in: RICHARDSON, G.H.: Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 15. Aufl., p. 189-201

American Public Health Association, Washington, D.C.

FRAZIER, W.C. (1926):

A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria.

J. Infect. Dis. 39, 302-309

FRAZIER, W.C., und P. RUPP (1928):

Studies on the proteolytic bacteria of milk. I. A medium for the direct isolation of caseolytic milk bacteria.

J. Bacteriol. 16, 57-64

DIESELBEN (1931):

Studies on the proteolytic bacteria of milk. V. Action of proteolytic bacteria on milk serum.

J. Bacteriol. 21, 263-271

FRAZIER, W.C., und D.C. WESTHOFF (1978a, b, c):

Food Microbiology, 3. Aufl., p. 60, 292-295, 412.

McGraw-Hill Book Company, New York

FREUDENREICH, E. (1895):

Bakteriologische Untersuchungen über den Reifungsprozess des Emmenthalkäses.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, II. Abt. 1, 168-179

FURUKAWA, Y., Y. FUJII und H. TAKAHASHI (1968):

Some properties of three proteolytic enzymes excreted by *Bacillus cereus* Kp 931.

Agr. Biol. Chem. 32, 822-829

GALE, E.F. (1946):

The bacterial amino acid decarboxylases.

Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 6, 1-32

GALLMANN, P., und Z. PUHAN (1983):

Vergleichende Untersuchungen zur Herstellung von Raclette-Käse aus roher und pasteurisierter Milch. II. β -Kasein-Hydrolyse durch Proteasen ausgewählter Mikroorganismen der Rohmilchflora.

Deutsche Molkerei-Zeitung 104, 748-753

GEBRE-EGZIABHER, A., E.S. HUMBERT und G. BLANKENAGEL (1980a):

Heat-stable proteases from psychrotrophs in milk.

J. Food Prot. 43, 197-200

DIESELBEN (1980b):

Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes.

J. Food Prot. 43, 709-712

GEIS, A., W. BOCKELMANN und M. TEUBER (1985):

Simultaneous extraction and purification of a cell wall-associated peptidase and β -casein specific protease from *Streptococcus cremoris* AC1.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 23, 79-84

GENIGEORGIS, C.A. (1981):

Recent trends in foodborne diseases of bacterial origin.

Proc. 8th Int. Symp. World Assoc. Vet. Food Hyg. (W.A.V.F.H.),

Dublin, 30. August - 4. September, p. 65-75

GIBSON, T., und R.E. GORDON (1974):

Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174; nom. gen. cons. Nomencl. Comm. Intern. Soc. Microbiol. 1937, 28; Opin. A. Jud. Comm. 1955, 39.

in: BUCHANAN, R.E., und N.E. GIBBONS: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8. Aufl., p. 529-550

The Williams and Wilkins Company, Baltimore

GILBERT, R.J., P.C.B. TURNBULL, J.M. PARRY und J.M. KRAMER (1981):

Bacillus cereus and other *Bacillus* species: Their part in food poisoning and other clinical infections.

in: BERKELEY, R.C.W., und M. GOODFELLOW: *The Aerobic Endospore-forming Bacteria: Classification and Identification*, p. 297-314, Academic Press, London

GOEPFERT, J.M., W.M. SPIRA, B.A. GLATZ und H.U. KIM (1973):

Pathogenicity of *Bacillus cereus*.

in: HOBBS, B.C., und J.H.B. CHRISTIAN: *The microbiological safety of food*, p. 69-75, Academic Press, London

GORDON, D.F., Jr., und M.L. SPECK (1965):

Bitterness in milk cultures of *Streptococcus cremoris*.

J. Dairy Sci. 48, 499-500

GREGERSEN, T. (1978):

Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria.

European J. Appl. Microbiol. 5, 123-127

GROSSKOPF, J.C., und W.J. HARPER (1969):

Role of psychophilic sporeformers in long life milk.

J. Dairy Sci. 52, 897

DIESELBEN (1974):

Isolation and identification of psychrotrophic sporeformers in milk.

Milchwissenschaft 29, 467-470

GROVE, H.-H., und G. TERPLAN (1975):

Erhebungen über Histamin- und Tyramingehalte in Trockenmilchprodukten.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 147-152

GUIGOZ, Y., und J. SOLMS (1974):

Isolation of a bitter tasting peptide from "Alpkäse", a Swiss mountain-cheese.
Lebensmitt.-Wiss. u. -Technol. 7, 356-357

HAHN, G. (1984):

Enterokokken: Ihre Bedeutung als Krankheitserreger, Indikatorkeime und Starterkulturen im Bereich der Lebensmittelhygiene.

in: SCHWEIZERISCHE GESELLSCHAFT FÜR LEBENSMITTELHYGIENE (SGLH):
Schriftenreihe Heft 14: Neue Erkenntnisse über die Erreger bakterieller Lebensmittel-Infektionen, p. 67-82

HAMPSON, S.E., G.L. MILLS und T. SPENCER (1963):

Observations on a protease from *Proteus mirabilis*.

Biochim. Biophys. Acta 73, 476-487

HANINGTON, E. (1967):

Preliminary report on tyramine headache.

Br. Med. J. 1967 II, 550-551

HARRIGAN, W.F., und M.E. Mc CANCE (1976a, b, c, d, e):

Laboratory methods in food and dairy microbiology, 2. Aufl., p. 53-54, 66-68, 71-72, 209, 351-352

Academic Press, London

HARTLEY, B.S. (1960):

Proteolytic enzymes.

Ann. Rev. Biochem. 29, 45-72

HASCHE, K.D., W. SCHAEGER, H. BLOBEL und J. BRÜCKLER (1977):

Reinigung einer Protease von *Staphylococcus aureus*.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 238, 300-309

HASTINGS, E.G. (1903):

Milchagar als Medium zur Demonstration der Erzeugung proteolytischer Enzyme.
Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, II.

Abt. 10, 384

DERSELBE (1904):

The action of various classes of bacteria on casein as shown by milk-agar plates.
Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, II.

Abt. 12, 590-592

HAUKE, H. (1967):

Die Mikrobiologie der Milch und Milchprodukte.

in: SCHÖNHERR, W.: Tierärztliche Milchhygiene, p. 119-183

S. Hirzel Verlag, Leipzig

HECHELMANN, H., und L. LEISTNER (1969):

Schnellnachweis gramnegativer Stäbchen.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 169-179

HEIDRICH, H.J., D. GROSSKLAUS und M. MÜLLING (1964a):

Vergleichende bakteriologische Untersuchungen an durch Handmelken und durch Venülenpunktion der Drüsenzisterne gewonnenen Milchen.

I. Untersuchungen an Venülmilchen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 77, 83-84

HEIDRICH, H.J., M. MÜLLING und H.W. BIRKNER (1964b):

Vergleichende bakteriologische Untersuchungen an durch Handmelken und durch Venülenpunktion der Drüsenzisterne gewonnen Milchen. II. Vergleichende Untersuchungen an Handmelk- und Venülmilchen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 77, 85-86

HEILMEIER, J. (1985):

Der Nachweis von käseereischädlichen Clostridien.

Deutsche Molkerei-Zeitung 106, 196-200

HOBBS, B.C. (1979):

Clostridium perfringens gastroenteritis.

in: RIEMANN, H., und F.L. BRYAN: Food-borne infections and intoxications, 2. Aufl., p. 131-171

Academic Press, New York

HOLMES, B., R.J. OWEN und T.A. McMEEKIN (1984):

Genus *Flavobacterium* Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntoon 1923, 97^{AL}.

in: KRIEG, N.R., und J.G. HOLT: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Band 1, 1. Aufl., p. 353-361

Williams and Wilkins, Baltimore, London

HORVÁTH, I., I. HANNY und A. PETHES (1964):

Massenaufreten von Lebensmittelvergiftungen, verursacht durch Bakterien der Gruppe Klebsiella.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 193, 191-195

HUGH, R., und E. LEIFSON (1953):

The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria.

J. Bacteriol. 66, 24-26

HUNTER, C.A., und P.R. ENSIGN (1947):

An epidemic of diarrhea in a new-born nursery caused by *Pseudomonas aeruginosa*.

Amer. J. Publ. Hlth. 37, 1 166-1 169

INSTITUT F. TIERÄRZTL. LEBENSMITTELKUNDE UND MILCHHYGIENE
DER TIERÄRZTL. HOCHSCHULE HANNOVER (1958):

Herstellung des Kalzium-Kaseinatagars zum Nachweis der Kaseolyten in Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 9, 141-142

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1969):

Seminar on psychrotrophic bacteria - conclusions.

Int. Dairy Fed. a. Bull. (in press), zit. n. THOMAS, S.B. (1969):

Methods of assessing the psychrotrophic bacterial content of milk.

J. appl. Bact. 32, 269-296

JACKMAN, D.M., F.M. BARTLETT und T.R. PATEL (1983):

Heat-stable proteases from psychrotrophic pseudomonads: Comparison of immunological properties.

Appl. Environ. Microbiol. 46, 6-12

JAKUBKE, H.-D., und H. JESCHKEIT (1981):

Lexikon Biochemie, 2. Aufl., p. 458-459

Verlag Chemie, Weinheim

JANDA, J.M., E.J. BOTTONE und M. REITANO (1983):

Aeromonas species in clinical microbiology: Significance, epidemiology, and speciation.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1, 221-228

JAY, J.M., und K.S. KONTOU (1967):

Fate of free amino acids and nucleotides in spoiling beef.

Appl. Microbiol. 15, 759-764

JEZESKI, J.J., und H. MACY (1946):

Cryophilic organisms in water and butter.

J. Dairy Sci. 29, 439-452

JOHNSON, K.M. (1984):

Bacillus cereus foodborne illness - an update.

J. Food Prot. 47, 145-153

JOOSTE, P.J., T.J. BRITZ und P.M. LATEGAN (1986):

The prevalence and significance of Flavobacterium strains in commercial salted butter.

Milchwissenschaft 41, 69-73

JUNI, E. (1984):

Genus III. Acinetobacter Brisou and Prévot 1954, 727^{AL}.

in: KRIEG, N.R., und J.G. HOLT: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Band 1, 1. Aufl., p. 303-307

Williams and Wilkins, Baltimore, London

JUVEN, B.J., S. GORDIN und A. LAUFER (1979):

Significance of psychrotrophic strains of Serratia liquefaciens in milk.

J. Food Prot. 42, 938-941

JUVEN, B.J., S. GORDIN, I. ROSENTHAL und A. LAUFER (1981):

Changes in refrigerated milk caused by Enterobacteriaceae.

J. Dairy Sci. 64, 1781-1784

KANDLER, O., und N. WEISS (1986):

Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, 212^{AL}.

in: SNEATH, P.H.A., N.S. MAIR, M.E. SHARPE und J.G. HOLT: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Band 2, 1. Aufl., p. 1209-1234

Williams and Wilkins, Baltimore, London

KARNOP, G. (1982a):

Die Rolle der Proteolyten beim Fischverderb. I. Optimierung der Methodik des Proteolytennachweises.

Arch. Lebensmittelhyg. 33, 57-61

DERSELBE (1982b):

Die Rolle der Proteolyten beim Fischverderb. II. Vorkommen und Bedeutung der Proteolyten als bakterielle Verderbsindikatoren.

Arch. Lebensmittelhyg. 33, 61-66

KAZANAS, N. (1968):

Proteolytic activity of microorganisms isolated from fresh water fish.

Appl. Microbiol. 16, 128-132

KELLER (1948):

Über das Auftreten von Butterfehlern.

Die Molkerei-Zeitung (Hildesheim) 2, 63-64

KERSTERS, K., und J. DE LEY (1984):

Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919, 936^{AL}.

in: KRIEG, N.R., und J.G. HOLT: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Band 1, 1. Aufl., p. 361-373

Williams and Wilkins, Baltimore, London

KEYNAN, A., und Z. EVENCHIK (1969):

Activation. in: GOULD, G.W., und A. HURST: The Bacterial Spore, p. 359-396.

Academic Press, London

KIELWEIN, G. (1968):

Feststellung und Bewertung von *Pseudomonaden* in Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 25-30

DERSELBE (1975):

Proteolyse von Milch und Milchprodukten durch *Pseudomonas fluorescens*.

Milchwissenschaft 30, 605-606

KIELWEIN, G., R. GERLACH und H. JOHNE (1968):

Pseudomonas aeruginosa: Untersuchungen über das Vorkommen in Rohmilch und die bakteriologische Charakterisierung.

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 145-154

DIESELBEN (1969):

Untersuchungen über das Vorkommen von *Aeromonas hydrophila* in Rohmilch.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 34-38

KIM, H.U., und J.M. GOEPFERT (1971):

Occurrence of *Bacillus cereus* in selected dry food products.

J. Milk Food Technol. 34, 12-15

KLETER, G. (1974):

The bacterial flora in aseptically drawn milk.

Neth. Milk Dairy J. 28, 220-237

KLETER, G., und T. DE VRIES (1974):

Aseptic milking of cows.

Neth. Milk Dairy J. 28, 212-219

KLIPSTEIN, F.A., R.F. ENGERT und H.B. SHORT (1977):

Relative enterotoxigenicity of coliform bacteria.

J. Infect. Dis. 136, 205-215

KNAUT, T., und A. ZABORNIK (1984):

Der Abbau von Milcheiweiß und nichtmizellarem Casein durch ungereinigte Pseudomonas-Proteasen.

Arch. Lebensmittelhyg. 35, 19-21

KÖNEKAMP, R. (1963):

Zu den fermentativen Eigenschaften der Milchsäurebakterien ("Lactobacillus Mejerinck"), zugleich ein Beitrag zur Vermeidung von Fehlfabrikaten bei Roh- und Brühwurst.

Arch. Lebensmittelhyg. 14, 56-62

KORNACKI, J.L., und E.H. MARTH (1982):

Foodborne illness caused by Escherichia coli: A review.

J. Food Prot. 45, 1051-1067

KRAMPE, F. (1972):

Erhebungen zur mikrobiologischen Beschaffenheit von Trockenmilchprodukten.

Diss. med. vet., Hannover

KRAUS, H. (1956):

Vergleichende Untersuchungen zur Haltbarkeit der pasteurisierten Trinkmilch und Vorzugsmilch unter besonderer Berücksichtigung des Nachweises aerober und anaerober Bazillen und Kaseolyten.

Arch. Lebensmittelhyg. 7, 13-21

DERSELBE (1960a):

Die Proteolyten in der Lebensmittelhygiene. 2. Mitteilung: Der Nachweis aerober Proteolyten mit einem geeigneten Nährmedium.

Arch. Lebensmittelhyg. 11, 33-36

DERSELBE (1960b):

Die Proteolyten in der Lebensmittelhygiene. 3. Mitteilung: Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur auf die Bildung, Wirkung und Inaktivierung von Proteasen proteolytischer Mikroorganismen.

Arch. Lebensmittelhyg. 11, 90-93

KROLL, S., und H. KLOSTERMEYER (1984):

Proteolytische Aktivitäten von Ps. fluorescens in Milch: Bestimmung mit Azocasein und vergleichsweise mit HPA.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 178, 179-186

KROLL, S., B. KELLERER, M. BUSSE und H. KLOSTERMEYER (1984):

Die proteolytisch aktiven psychrotrophen Bakterien in Rohmilch. 1. Differenzierung aufgrund stoffwechselphysiologischer Merkmale.

Milchwissenschaft 39, 538-540

KRUEGER, R. (1890):

Bakteriologisch-chemische Untersuchung käsiger Butter.

Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde 7, 425-430, 464-469, 493-496

KUBOTA, Y., und P.V. LIU (1971):

An enterotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*.

J. Infect. Dis. 123, 97-98

KURZWEIL, R., und M. BUSSE (1973):

Keimgehalt und Florazusammensetzung der frisch ermolkenen Milch.

Milchwissenschaft 28, 427-431

LAGERBORG, V.A., und W.E. CLAPPER (1952):

Amino acid decarboxylases of lactic acid bacteria.

J. Bacteriol. 63, 393-397

LANGEVELD, L.P.M., F. CUPERUS und J. STADHOUDERS (1973):

Bacteriological aspects of the keeping quality at 5°C of reinfected and non-reinfected pasteurized milk.

Neth. Milk Dairy J. 27, 54-65

LAW, B.A. (1977):

Dipeptide utilization by starter streptococci.

J. Dairy Res. 44, 309-317

DERSELBE (1978):

Peptide utilization by group N streptococci.

J. Gen. Microbiol. 105, 113-118

DERSELBE (1979):

Reviews of the progress of dairy science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products.

J. Dairy Res. 46, 573-588

DERSELBE (1980):

Transport and utilization of proteins by bacteria.

in: PAYNE, J.W.: Microorganisms and Nitrogen Sources, p. 381-409, 783-786

John Wiley and Sons, Chichester, New York

LAW, B.A., und M.E. SHARPE (1978a):

Streptococci in the dairy industry.

in: SKINNER, F.A., und L.B. QUESNEL: Streptococci, p. 263-278

Academic Press, London

DIESELBEN (1978b):

Formation of methanethiol by bacteria isolated from raw milk and Cheddar cheese.

J. Dairy Res. 45, 267-275

LAW, B.A., A.T. ANDREWS und M.E. SHARPE (1977):

Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk.

J. Dairy Res. 44, 145-148

LAW, B.A., E. SEZGIN und M.E. SHARPE (1976):
Amino acid nutrition of some commercial cheese starters in relation to their growth in peptone-supplemented whey media.
J. Dairy Res. 43, 291-300

LAW, B.A., M.E. SHARPE und B. REITER (1974):
The release of intracellular dipeptidase from starter streptococci during Cheddar cheese ripening.
J. Dairy Res. 41, 137-146

LAW, B.A., C.M. COUSINS, M.E. SHARPE und F.L. DAVIES (1979):
Psychrotrophs and their effects on milk and dairy products.
in: RUSSELL, A.D., und R. FULLER: Cold tolerant microbes in spoilage and the environment, p. 137-152
Academic Press, London

LAWRENCE, R.C., und W.B. SANDERSON (1969):
A micro-method for the quantitative estimation of rennets and other proteolytic enzymes.
J. Dairy Res. 36, 21-29

LEADBETTER, E.R. (1974):
Genus I. Cytophaga Winogradsky 1929, 577; Lewin 1969, 191 emend. mut. char.
in: BUCHANAN, R.E., und N.E. GIBBONS: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Aufl., p. 101-105
The Williams and Wilkins Company, Baltimore

LEE, J.S. (1976):
Proteolytic microorganisms.
in: SPECK, M.L.: Compendium of methods for the microbiological examination of foods, p. 190-193
American Public Health Association, Inc., Washington D.C.

LEINMÜLLER, R., und J. CHRISTOPHERSEN (1982):
Beobachtungen zur Hitzeinaktivierung und Charakterisierung thermoresistenter Proteasen aus *Pseudomonas fluorescens*.
Milchwissenschaft 37, 472-475

LERKE, P., R. ADAMS und L. FARBER (1967):
Bacteriology of spoilage of fish muscle. IV. Role of protein.
Appl. Microbiol. 15, 770-776

LEVIN, R.E. (1968):
Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish.
I. Methodology.
Appl. Microbiol. 16, 1734-1737

LIGHTBODY, L.G. (1961):
Proteolytic organisms in butter.
Queensland J. agric. Sci. 18, 109-122

LOWRIE, R.J., R.C. LAWRENCE, L.E. PEARCE und E.L. RICHARDS (1972):
Cheddar cheese flavour. III. The growth of lactic streptococci during cheese-
making and the effect on bitterness development.
N. Z. J. Dairy Sci. Tech. 7, 44-50

LÜCK, H., E. VOGEL, K. FLEISCHMANN, A. PAVLIK und W. SAUMWEBER (1964):
Untersuchungen über die Veränderungen von rekombinierter Milch während der
Lagerung. II. Mitteilung: Nichtfällbare ninhydrinpositive Substanzen.
Milchwissenschaft 19, 368-374

MABBITT, L.A. (1981):
Metabolic activity of bacteria in raw milk.
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 33, 273-280

MACAULAY, D.M., R.Z. HAWIRKO und N. JAMES (1963):
Effect of pasteurization on survival of certain psychrophilic bacteria.
Appl. Microbiol. 11, 90-92

MADDOX, I.S., und J.S. HOUGH (1970):
Proteolytic enzymes of *Saccharomyces carlsbergensis*.
Biochem. J. 117, 843-852

MAIR-WALDBURG, H., und W. STURM (1958):
Untersuchungen über bittere Emmentalerkäse.
Deutsche Molkerei-Zeitung 79, 1585-1588

MARSHALL, R.T., D.M. ADAMS, D.R. MORGAN, N.F. OLSEN und C.H. WHITE
(1985):
Microbiological methods for dairy products. in: RICHARDSON, G.H.: Standard
Methods for the Examination of Dairy Products, 15. Aufl., p. 203-218
American Public Health Association, Washington, D.C.

MARTLEY, F.G., S.R. JAYASHANKAR und R.C. LAWRENCE (1970):
An improved agar medium for the detection of proteolytic organisms in total
bacterial counts.
J. appl. Bact. 33, 363-370

MATSUBARA, H., und J. FEDER (1971):
Other bacterial, mold, and yeast proteases.
in: BOYER, P.D.: The Enzymes, Band 3, 3. Aufl., p. 721-795
Academic Press, New York and London

MAYERHOFER, H.J., M. LU, R.T. MARSHALL und C.H. WHITE (1971):
Heat stable proteases from psychrophilic bacteria.
J. Dairy Sci. 54, 763

DIESELBEN (1973):
Characterization of a heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P 26.
Appl. Microbiol. 25, 44-48

McKELLAR, R.C. (1981):

Development of off-flavours in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis.

J. Dairy Sci. 64, 2138-2145

MELLING, J., und B.J. CAPEL (1978):

Characteristics of *Bacillus cereus* emetic toxin.

FEMS Microbiology Letters 4, 133-135

MENNINGER, H. (1957):

Bakteriologische Probleme der Milchtrocknung.

Deutsche Molkerei-Zeitung 78, 941-945

MEYER, H. (1975):

Über den Nachweis eiweißlösender Bakterien (Kaseolyten) in Säuglingsnahrung.

Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 71, 314-317

MILLER, I., und O. KANDLER (1967a):

Eiweißabbau und Anreicherung freier Aminosäuren durch Milchsäurebakterien in Milch. I. Die Veränderung der Stickstoff-Fractionen.

Milchwissenschaft 22, 150-159

DIESELBEN (1967b):

Eiweißabbau und Anreicherung freier Aminosäuren durch Milchsäurebakterien in Milch. II. Die Anreicherung freier Aminosäuren durch Thermobakterien.

Milchwissenschaft 22, 469-480

DIESELBEN (1967c):

Eiweißabbau und Anreicherung freier Aminosäuren durch Milchsäurebakterien in Milch. III. Die Anreicherung von freien Aminosäuren durch Streptobakterien und Streptokokken.

Milchwissenschaft 22, 608-615

MITCHELL, G.E., K.N. EWINGS und J.P. BARTLEY (1986):

Physicochemical properties of proteinases from selected psychrotrophic bacteria.

J. Dairy Res. 53, 97-115

MORIHARA, K. (1974):

Comparative specificity of microbial proteinases.

Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 41, 179-243

MOSSEL, D.A.A. (1956):

Aufgaben und Durchführung der modernen hygienisch-bakteriologischen Lebensmittelüberwachung.

Wien. tierärztl. Mschr. 43, 321-340, 596-610

DERSELBE (1975):

Water and micro-organisms in foods - a synthesis.

in: DUCKWORTH, R.B.: Water relations of foods, p. 347-361

Academic Press, London

MUIR, D.D., und J.D. PHILLIPS (1984):

Prediction of the shelf life of raw milk during refrigerated storage.

Milchwissenschaft 39, 7-11

- MUIR, D.D., J.D. PHILLIPS und D.G. DALGLEISH (1979):
The lipolytic and proteolytic activity of bacteria isolated from blended raw milk.
Journal of the Society of Dairy Technology 32, 19-23
- MUMME, C. (1955):
Über die bakterielle Nahrungsmittelvergiftung. Zur Praxis der klinischen und bakteriologisch-tierexperimentellen Differentialdiagnose.
Med. Klin. 50, 125-130
- NATH, K.R., und R.A. LEDFORD (1972):
Caseinolytic activity of micrococci isolated from Cheddar cheese.
J. Dairy Sci. 55, 1424-1427
- NESENI, R. (1948):
Die Eiweißstoffe der Butter.
Milchwissenschaft 3, 190-193
- O'CONNOR, R.E., K.N. EWINGS, A.C. HAYWARD und P.K. O'ROURKE (1986):
Numerical taxonomy of proteolytic psychrotrophs from Queensland raw milks.
J. appl. Bact. 61, 25-38
- OLIVEIRA, J.S. DE (1969/1970):
Inhibition of *Pseudomonas putrefaciens* by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*.
Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos 3, 115-128,
zit. n. Dairy Sci. Abstr. 36 (1974), 534
- ORMAY, L., und T. NOVOTNY (1970):
Über sogenannte unspezifische Lebensmittelvergiftungen in Ungarn.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 215, 84-89
- OTTE, I., G. HAHN und A. TOLLE (1978):
Vorkommen, Nachweis und Bedeutung von *Ps. aeruginosa* in Rohmilch und in der Umgebung von Milchtieren.
Milchwissenschaft 33, 737-739
- OVERCAST, W.W., und K. ATMARAM (1974):
The role of *Bacillus cereus* in sweet curdling of fluid milk.
J. Milk Food Technol. 37, 233-236
- PARKER, R.B. (1956):
Detection of proteolytic organisms in dairy products.
J. Milk Food Technol. 19, 10-12
- PATEL, T.R., F.M. BARTLETT und J. HAMID (1983a):
Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic pseudomonads.
J. Food Prot. 46, 90-94, 97
- PATEL, T.R., D.M. JACKMAN und F.M. BARTLETT (1983b):
Heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* T 16: Purification by affinity column chromatography and characterization.
Appl. Environ. Microbiol. 46, 333-337

- PELISSIER, J.-P., J.-C. MERCIER und B. RIBADEAU DUMAS (1974):
Problème de l'amertume dans les fromages. Résultats d'une enquête.
Revue laitière française 325, 817, 820-821
- PERLÈS, R., und J.-É. COURTOIS (1964):
Les protéases. in: BOULANGER, P., und J. POLONOVSKI: *Traité de Biochimie Générale*, Teil II: Les agents des synthèses et des dégradations biochimiques.
Zweiter Teilband: Les enzymes, p. 450-516
Masson et C^{ie}, Paris
- PETRITSCHKE, A., F. LYNEN und H.-D. BELITZ (1972):
Untersuchungen über Bitterpeptide. II. Auftreten von Bittergeschmack in enzymatischen Hydrolysaten verschiedener Proteine.
Lebensm.-Wiss. u. Technol. 5, 77-81
- PITT, T.L., und D. DEY (1970):
A method for the detection of gelatinase production by bacteria.
J. appl. Bact. 33, 687-691
- POHJA, M.S., F. RIGLER und F.P. NIINIVAARA (1960):
Ein Verfahren zum Nachweis der Proteolyse im Fleisch.
Fleischwirtsch. 12, 834-835
- PRIEBE, K. (1984):
Beitrag zur Eignung des Histamingehaltes als Maßstab der Verderbnis von Fischen.
Arch. Lebensmittelhyg. 35, 123-128
- PRIEST, F.G. (1977):
Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*.
Bacteriol. Rev. 41, 711-753
- PÜRSCHEL, M., und C. POLLACK (1972):
Proteolytischer Abbau der Milcheiweißstoffe durch Bakterien. 2. Mitt. Die Wirkung von psychrophilen und milchsäurebildenden Bakterien auf die Eiweißstoffe in der Milch.
Nahrung 16, 451-459
- RENNER, E. (1982):
Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen, 4. Aufl., p. 301.
Volkswirtschaftlicher Verlag, München
- REUTER, G. (1971):
Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischwaren.
6. Mitteilung: Proteolytische Enzymaktivitäten.
Fleischwirtsch. 51, 945-952
- RICHARD, C. (1984):
Genus VI. *Enterobacter* Hormaeche and Edwards 1960, 72^{AL}; Nom. Cons. Opin. 28, Jud. Comm. 1963, 38.
in: KRIEG, N.R., und J.G. HOLT: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Band 1, 1. Aufl., p. 465-469
Williams and Wilkins, Baltimore, London

ROEMMELE, O. (1957):

Sozialhygienische Bedenken zu den Prüfungsvorschriften von Kindertrockenmilch.
Arch. Lebensmittelhyg. 8, 110-111

ROEMMELE, O., und W. WESTPHAL (1957):

Ergebnisse und Vorschläge über die hygienische Prüfung von Kindertrockenmilchen.
Milchwissenschaft 12, 133-141

ROSENBERGER, R.F. (1951):

The development of methods for the study of obligate anaerobes in silage.
Proc. Soc. Appl. Bact. 14, 161-164

SAITNER, M. (1949):

Was sagt uns die DLG-Butterprüfung in Frankfurt am Main?
Süddeutsche Molkerei-Zeitung (Kempten) 70, Folge 45, Umschlagblatt

SAKAGUCHI, G. (1979):

Botulism. in: RIEMANN, H., und F.L. BRYAN: Food-borne infections and intoxications, 2. Aufl., p. 389-442
Academic Press, New York

SCHLEIFER, K.H., und R. KILPPER-BÄLZ (1984):

Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 31-34

SCHÖNBERG, F. (1949):

Zur Entstehung und Verhütung sogenannter unspezifischer bakterieller Lebensmittelvergiftungen, insbesondere von Fäulnisintoxikationen.
Tierärztl. Umschau 4, 149-151

SCHÖNBERG, F., und R. KÖNEKAMP (1962):

Zur Temperaturabhängigkeit der von aeroben Bazillen, insbesondere von *Bac. cereus* und *Bac. subtilis*, verursachten Proteolyse in Fleisch, Fleischwaren, Fischwaren und Milch. Zugleich ein Beitrag zur Entstehung der sogenannten unspezifischen Lebensmittelvergiftungen (Fäulnisintoxikationen).
Arch. Lebensmittelhyg. 13, 58-63

SCHÖNBERG, F., und H. KRAUS (1956a):

Zur Bedeutung der laufenden Prüfung der Anlieferungsmilch in Molkereien auf Kaseolyten. Einführung der Albuminwasserprobe zum Nachweis der Kaseolyten.
Arch. Lebensmittelhyg. 7, 132-135

DIESELBEN (1956b):

Über die Bedeutung der richtigen Vorbereitung des Streumaterials im Milchtierstall, insbesondere im Vorzugsmilchbetrieb, zur Verringerung der Infektion der Milch mit Kaseolyten.
Arch. Lebensmittelhyg. 7, 253-254

DIESELBEN (1958):

Zur Feststellung und Bewertung von Kaseolyten in Vorzugsmilch.
Arch. Lebensmittelhyg. 9, 199-200

SCHULZ, M.E., und E. VOSS (1965):

Das große Molkerei-Lexikon, 4. Aufl., Band 2, p. 946.
Volkswirtschaftlicher Verlag G.m.b.H., Kempten

SEIDEL, G. (1964):

Schlußfolgerungen aus den Lebensmittelvergiftungen der letzten Jahre.
Arch. Lebensmittelhyg. 15, 89-91, 107-109

SEN, N.P. (1969):

Analysis and significance of tyramine in foods.
J. Food Sci. 34, 22-26

SHEHATA, T.É., und E.B. COLLINS (1971):

Isolation and identification of psychrophilic species of *Bacillus* from milk.
Appl. Microbiol. 21, 466-469

SINELL, H.-J. (1985):

Einführung in die Lebensmittelhygiene, 2. Aufl., p. 68.
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

SINGH, J., und D.K. SHARMA (1983):

Proteolytic breakdown of casein and its fractions by lactic acid bacteria.
Milchwissenschaft 38, 148-149

SIZEMORE, R.K., und L.H. STEVENSON (1970):

Method for the isolation of proteolytic marine bacteria.
Appl. Microbiol. 20, 991-992

SLOBODSKA-ZAYKOWSKA, N. (1925):

Über die Anwendung des Milchagars von Freudenreich bei der Untersuchung
der Milchsäurebakterien.
Biochem. Zschr. 159, 216-220

SMITH, N.R., R.E. GORDON und F.E. CLARK (1952):

Aerobic sporeforming bacteria.
U.S. Dep. Agric. Monograph no. 16, p. 43

SNEATH, P.H.A., und D. JONES (1986):

Genus *Brochothrix* Sneath and Jones 1976, 102^{AL}.
in: SNEATH, P.H.A., N.S. MAIR, M.E. SHARPE und J.G. HOLT: Bergey's Ma-
nual of Systematic Bacteriology, Band 2, 1. Aufl., p. 1249-1253
Williams and Wilkins, Baltimore, London

STADHOUDERS, J., G. HUP und F. HASSING (1982):

The conceptions index and indicator organisms discussed on the basis of the
bacteriology of spray-dried milk powder.
Neth. Milk Dairy J. 36, 231-260

STEPANIAK, L., und P.F. FOX (1985):

Isolation and characterization of heat stable proteinases from *Pseudomonas* iso-
late AFT 21.
J. Dairy Res. 52, 77-89

- STONE, W.K., und D.M. NAFF (1967):
Increases in soluble nitrogen and bitter flavour development in cottage cheese.
J. Dairy Sci. 50, 1497-1500
- SULLIVAN, J.J., L. MOU, J.I. ROOD und G.R. JAGO (1973):
The enzymic degradation of bitter peptides by starter streptococci.
Aust. J. Dairy Technol. 28, 20-26
- TARRANT, P.J.V., A.M. PEARSON, J.F. PRICE und R.V. LECHOWICH (1971):
Action of *Pseudomonas fragi* on the proteins of pig muscle.
Appl. Microbiol. 22, 224-228
- TERPLAN, G. (1969):
Biologische, chemische und physikalische Vorgänge bei der Herstellung von gepökelten und gereiften Fleischwaren, p. 112-121.
Gerhard Röttger Verlag, München
- TERPLAN, G., und H. ANGERSBACH (1972):
Die technologische Bedeutung von Streptokokken.
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 244-247
- TERPLAN, G., S. WENZEL und H.-H. GROVE (1973):
Zur Histamin- und Tyraminbildung durch Mikroorganismen in Milch und Milchprodukten.
Wien. tierärztl. Mschr. 60, 46-50
- THOMAS, T.D., B.D.W. JARVIS und N.A. SKIPPER (1974):
Localization of proteinase(s) near the cell surface of *Streptococcus lactis*.
J. Bacteriol. 118, 329-333
- TOLLE, A. (1979):
Bacterial association and metabolic activity in milk and dairy products.
Arch. Lebensmittelhyg. 30, 84-87
- TORRIE, J.P., H. CHOLETTE, D.A. FROELICH und R.C. McKELLAR (1983):
Growth of an extracellular proteinase-deficient strain of *Pseudomonas fluorescens* on milk and milk proteins.
J. Dairy Res. 50, 365-374
- VAN DER ZANT, W.C. (1957):
Proteolytic enzymes from *Pseudomonas putrefaciens*. I. Characteristics of an extracellular proteolytic enzyme system.
Food Res. 22, 151-157
- VAN DER ZANT, W.C., und F.E. NELSON (1953):
Proteolysis by *Streptococcus lactis* grown in milk with and without controlled pH.
J. Dairy Sci. 36, 1104-1111
- VISSER, F.M.W. (1977):
Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 2. Development of bitterness and cheese flavour.
Neth. Milk Dairy J. 31, 188-209

- VOIGT, M.N., R.R. EITENMILLER, P.E. KOEHLER und M.K. HAMDY (1974):
Tyramine, histamine, and tryptamine content of cheese.
J. Milk Food Technol. 37, 377-381
- WAGENAAR, R.O. (1952):
The bacteriology of surface-taint butter: a review.
J. Dairy Sci. 35, 403-423
- WALSTRA, P., und R. JENNESS (1984):
Dairy Chemistry and Physics, p. 129, 207-208.
John Wiley and Sons, New York
- WASHAM, C.J., H.C. OLSON und E.R. VEDAMUTHU (1977):
Heat-resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurized milk.
J. Food Prot. 40, 101-108
- WATSON, I.M., J.O. ROBINSON, V. BURKE und M. GRACEY (1985):
Invasiveness of *Aeromonas* spp. in relation to biotype, virulence factors, and clinical features.
J. Clin. Microbiol. 22, 48-51
- WHITE, C.H., und R.T. MARSHALL (1973):
Heat stable protease from *Pseudomonas fluorescens* P 26 degrades ultra-high temperature pasteurized milk.
J. Dairy Sci. 56, 624
- WHITE, C.H., W.T. GILLIS, D.L. SIMMLER, M.K. GALAL, J.R. WALSH und J.T. ADAMS (1978):
Evaluation of raw milk quality tests.
J. Food Prot. 41, 356-360
- WHITNEY, R.McL., J.R. BRUNNER, K.E. EBNER, H.M. FARRELL, Jr., R.V. JOSEPHSON, C.V. MORR und H.E. SWAISGOOD (1976):
Nomenclature of the proteins of cow's milk: Fourth revision.
J. Dairy Sci. 59, 795-815
- WIESE, W. von (1986):
Ein Vergleich mikrobiologischer Qualitätsstandards und Spezifikationen, die im internationalen Handel mit Säuglings- und Kleinkindernahrung angewandt werden.
Arch. Lebensmittelhyg. 37, 123-125
- WIESER, H., und H.-D. BELITZ (1975):
Zusammenhänge zwischen Struktur und Bittergeschmack bei Aminosäuren und Peptiden. I. Aminosäuren und verwandte Verbindungen.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 159, 65-72
- DIESELBEN (1976):
Zusammenhänge zwischen Struktur und Bittergeschmack bei Aminosäuren und Peptiden. II. Peptide und Peptidderivate.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 160, 383-392

WILLIAMSON, W.T., S.B. TOVE und M.L. SPECK (1964):
Extracellular proteinase of *Streptococcus lactis*.
J. Bacteriol. 87, 49-53

WITTER, L.D. (1961):
Psychrophilic bacteria - a review.
J. Dairy Sci. 44, 983-1015

YAN, L., B.E. LANGLOIS, J. O'LEARY und C.L. HICKS (1985):
Purification and characterization of four extracellular proteases isolated from
raw milk psychrotrophs.
J. Dairy Sci. 68, 1323-1336

ZAADHOF, K.-J., und G. TERPLAN (1967):
Zur Eignung verschiedener Nährmedien für den Nachweis von Clostridien und
Proteolyten in Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 18, 27-30

ZABORNIAK, A., und T. KNAUT (1984):
Zur Charakteristik der *Alcaligenes*-Proteasen.
Arch. Lebensmittelhyg. 35, 41-43

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. H. Becker für die ständige Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. K. Osterkorn danke ich für die Beratung in Fragen der Statistik.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. K.-J. Zaadhof, Frau M. Schmidt und allen anderen Mitarbeitern des Instituts, die mich mit Rat und Hilfe unterstützt haben.

Für das Schreiben der Arbeit herzlichen Dank an Frau Spensberger.

Lebenslauf

Am 1. Februar 1959 wurde ich, Berthold Laufer, als Sohn des Werkzeugschleifers Georg Laufer und seiner Frau Martha, geb. Kuhner, in Schramberg/Schwarzwald geboren.

Von 1966 bis 1969 besuchte ich die Grundschule in Hardt und von 1969 bis 1979 das Gymnasium in Schramberg, wo ich im Mai 1979 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1979/80 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Tiermedizin, das ich im Dezember 1984 mit dem Staatsexamen abschloß. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich im Januar 1985.

Im Februar 1985 begann ich am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit der Anfertigung meiner Dissertation.

